

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología Molecular**



**TESIS DOCTORAL**

**Nuevos modelos genéticos murinos para  
el estudio del endotelio vascular sanguíneo:  
análisis de la relevancia de c-Met  
durante la neovascularización en el ratón**

**Memoria para optar al grado de Doctor  
presentada por  
RODRIGO DIÉGUEZ HURTADO**

**Dirigida por:  
SAGRARIO ORTEGA JIMÉNEZ**

**Madrid, Junio 2012**





Memoria presentada por Rodrigo Diéguez Hurtado, licenciado en Medicina Veterinaria, para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de la Doctora Sagrario Ortega Jiménez, en la Unidad de Ratones Transgénicos del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). El proyecto de investigación en el que se enmarca ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y por la Comunidad Autónoma de Madrid a través de un Contrato de Personal Investigador de Apoyo en beneficio del doctorando.



***Para Wendy, Amalia y Nicolás,  
mis puntos cardinales,  
mi ilusión, motivo e inspiración.***



## **AGRADECIMIENTOS**

A Sagrario Ortega por su dirección y apoyo incondicional durante todos estos años. Por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y de entrar al mundo de la Biología Molecular y los modelos genéticos murinos. Por su cercanía y comprensión.

A todos los miembros, pasados y presentes, de la Unidad de Ratones Transgénicos por su compañerismo y dedicación. En mayor o menor medida todos estos modelos han pasado por vuestras manos para recibir siempre lo mejor.

A Miriam García por su fantástica labor como técnico de animalario. Su dedicación en la atención de nuestra colonia y su esmero por ayudar en todo lo que fuera necesario.

A todas las personas que forman parte de las Unidades de Patología Comparada, Microscopía Confocal, Anticuerpos Monoclonales, Citometría de Flujo, Imagen Molecular y Animalario, por los excelentes servicios de apoyo prestados, que van mucho más allá de lo puramente técnico. Especialmente a Marta Cañamero, Diego Megías, Lola Martínez, Giovanna Roncador, Manuel Pérez, Joaquim Soriano, Patricia González, Virginia Álvarez y Elvira Gil.

Al Director del Programa de Biotecnología del CNIO, Fernando Peláez, por su respaldo constante y decidido.

A Celia Ramos, secretaria del Programa de Biotecnología, por su eficaz ayuda en los más disímiles escenarios.

A todas las personas vinculadas al CNIO que, de una u otra manera, colaboran activamente en facilitar nuestro trabajo: personal de limpieza, recepción, seguridad, cafetería, almacén, mantenimiento, sistemas de información, compras, etc.

Al personal del Área de Promoción de Personal Investigador de la Consejería de Educación y Empleo de la Comunidad de Madrid por su apoyo en la gestión del contrato.

A Wendy, por su paciencia infinita, por tanto amor y el que nos queda por compartir.

A mis familias, la de sangre y la que la vida me regaló por su cariño y por esa sensación tan reparadora de saber que siempre estarán ahí.

A Sylvia por ver en mi, hace ya mucho tiempo, lo que quizá algún día llegue a ser.



---

# ÍNDICE

---





<b>Resumen /Abstract</b>	<b>3</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>7</b>
<b>Introducción</b>	<b>11</b>
1. Estructura y función de los vasos sanguíneos	11
2. Origen y relevancia del endotelio vascular	12
3. La formación de nuevos vasos sanguíneos	12
3.1 Angiogénesis fisiológica	13
3.1.1 Desarrollo del sistema vascular en la embriogénesis	13
3.1.2 Neovascularización en el organismo adulto	14
3.2 Angiogénesis tumoral	14
4. La ruta de señalización de HGF/c-Met	17
4.1 El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)	17
4.2 El receptor tirosina quinasa c-Met	19
4.3 Señalización intracelular mediada por c-Met	19
4.4 Funciones fisiológicas de HGF/c-Met	21
4.5 Funciones de HGF/c-Met en la progresión tumoral	22
4.6 Participación de HGF/c-Met en la angiogénesis	22
5. Los receptores de angiopoyetinas	24
5.1 Estructura y función del receptor Tie2	24
5.2 Patrón de expresión del gen <i>Tie2</i>	26
5.2.1 Como marcador de fenotipo endotelial	26
5.2.2 Expresión de Tie2 en células hematopoyéticas	27
5.2.3 Expresión de Tie2 en la vasculatura tumoral	27
6. Modelos murinos genéticos basados en secuencias de los receptores Tie	28
6.1 Modelos de recombinación tejido-específica	28
6.2 Modelos de expresión de proteínas trazadoras	30
6.3 Otros modelos murinos para el estudio de la biología vascular	31
<b>Objetivos</b>	<b>35</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>39</b>
1. Generación del modelo <i>Tie2</i> <sup>CreERT2</sup>	39
1.1 Construcción del vector de <i>targeting</i> Tie2-IRES-CreERT2	39
1.2 Electroporación en células ES	40
1.3 Análisis de clones recombinantes positivos: <i>Southern Blot</i>	40
1.4 Introducción de células ES recombinantes a embriones en desarrollo	41
1.5 Genotipado y cruzamientos	42

1.6 Análisis de expresión protéica mediante <i>Western Blot</i>	42
2. Caracterización del modelo <i>Tie2</i> <sup>CreERT2</sup>	43
2.1 Preparación y administración de tamoxifeno	43
2.1.1 Dieta suplementada con tamoxifeno	43
2.1.2 Preparación de tamoxifeno para inyección intraperitoneal en animales adultos	43
2.1.3 Preparación de tamoxifeno para inyección intragástrica en neonatos	43
2.2 Análisis de expresión de $\beta$ -galactosidasa	44
2.2.1 Tinción X-gal de muestras en preparación completa ( <i>whole mount</i> )	44
2.2.2 Tinción X-gal de criosecciones	44
2.2.3 Inmunohistoquímica	45
2.2.4 Cuantificación de la eficiencia de recombinación	45
2.3 Análisis de poblaciones hematopoyéticas mediante citometría de flujo	46
2.3.1 Preparación de suspensiones celulares	46
2.3.1.1 Suspensiones celulares de la médula ósea	46
2.3.1.2 Suspensiones celulares de sangre periférica	46
2.3.1.3 Suspensiones celulares del bazo	47
2.3.2 Inmunodetección de marcadores de superficie	47
2.3.3 Adquisición y análisis de datos	47
2.4 Visualización y análisis del desarrollo vascular de la retina	48
2.4.1 Disección de la retina del ratón	48
2.4.2 Tinción X-gal de la retina del ratón	48
3. Inactivación inducible de c-Met en el endotelio vascular sanguíneo	48
3.1 Ensayo de cicatrización de heridas	48
3.2 Ensayo de hipersensibilidad por contacto	49
3.3 Ensayo de carcinogénesis química	50
4. Generación del modelo Tg.CAG-LSL-Katushka	51
4.1 Construcción del plásmido pCAG-LSL-Katushka y generación de ratones transgénicos	51
4.2 Análisis de la descendencia e identificación de animales transgénicos	51
4.3 Análisis del número de copias y eventos de integración del transgén	52
4.4 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad trazadora de pCAG-LSL-Katushka	52
5. Caracterización y aplicaciones de los modelos Tg.CAG-LSL-Katushka y Tg.CAG-Katushka	53
5.1 Observación de fluorescencia <i>in vivo</i>	53
5.1.1 Detección de epifluorescencia	53
5.1.2 Detección de fluorescencia <i>in vivo</i> mediante técnicas no invasivas	53
5.2 Observación de fluorescencia <i>ex vivo</i>	54
5.2.1 Muestras en preparación completa	54
5.2.2 Criosecciones	55
5.2.3 Mórulas y blastocistos	55
5.2.4 Retinas	55

5.2.5 Detección de fluorescencia nativa e inmunofluorescencia en piel	56
5.3 Detección de fluorescencia mediante citometría de flujo	57
5.4 Ensayos de xenotransplante	57
5.4.1 Líneas celulares	57
5.4.2 Inoculación de líneas celulares en ratones atímicos desnudos	58
5.4.3 Monitorización <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i> del crecimiento tumoral	58
<b>Resultados</b>	<b>61</b>
1. Generación del modelo <i>Tie2</i> <sup>CreERT2</sup>	61
1.1 Construcción del vector de <i>targeting</i> <i>Tie2</i> <sup>IRES-CreERT2</sup>	62
1.1.1 Análisis del locus <i>Tie2</i>	62
1.1.2 Diseño del vector de <i>targeting</i>	63
1.1.3 Construcción del vector de <i>targeting</i>	64
1.2 Obtención y selección de clones recombinantes homólogos	66
1.3 Generación de quimeras y transmisión en la línea germinal	67
1.4 Eliminación del casete de selección PGK-neo	68
2. Caracterización del modelo <i>Tie2</i> <sup>CreERT2</sup>	68
2.1 Análisis de la expresión del gen <i>Tie2</i> después de la recombinación homóloga	68
2.2 Especificidad y eficiencia de la recombinación mediada por Cre	69
2.2.1 Cruce con la línea <i>Rosa26</i> <sup>LSLlacZ</sup>	69
2.2.2 Inducción de la actividad de Cre durante el desarrollo embrionario	70
2.2.2.1 Evaluación de la tolerancia al tamoxifeno durante la gestación	70
2.2.2.2 Análisis de la expresión de <i>Tie2</i> durante el desarrollo embrionario	72
2.2.3 Inducción de la actividad de Cre durante el desarrollo perinatal	76
2.2.4 Inducción de la actividad de Cre en el animal adulto	78
2.2.5 Análisis de la especificidad por el endotelio vascular sanguíneo	83
2.2.6 Análisis de la recombinación en células del linaje hematopoyético	86
2.2.7 Comparación con modelos transgénicos de recombinación inducible basados en <i>Tie2</i>	88
2.2.8 Visualización y análisis del desarrollo vascular de la retina	90
2.2.8.1 Nueva herramienta para el estudio de fenotipos vasculares en la retina	91
2.2.8.2 Análisis de la expresión de <i>Tie2</i> en la vasculatura de la retina	92
3. Inactivación inducible de c-Met en el endotelio vascular sanguíneo	94
3.1 Inactivación de c-Met durante el desarrollo embrionario	96
3.2 Inactivación de c-Met en el endotelio vascular de animales adultos	99
3.2.1 c-Met en neovascularización asociada a procesos fisiológicos: fertilidad, gestación y lactación	99
3.2.2 c-Met en neovascularización inducida en procesos patológicos experimentales	100
3.2.2.1 Relevancia de c-Met endotelial en la cicatrización de heridas	100
3.2.2.2 Relevancia de c-Met endotelial en la reacción de hipersensibilidad por contacto	105
3.2.2.3 Relevancia de c-Met endotelial en un modelo de carcinogénesis de piel	107

4. Generación de un modelo trazador de la actividad de Cre basado en la expresión de la proteína roja fluorescente Katushka (Tg.CAG-LSL-Katushka)	111
4.1 Construcción del transgén y validación <i>in vitro</i>	111
4.2 Generación de ratones transgénicos	113
4.3 Caracterización de la integración del transgén y análisis de la transmisión en línea germinal	113
5. Caracterización del modelo Tg.CAG-LSL-Katushka	114
5.1 Cruce con un modelo inductor de recombinación ubicua	114
5.2 Cruce con modelos inductores de recombinación tejido-específica	117
5.2.1 Cruce con la línea transgénica Tg.Sox2-Cre	117
5.2.2 Cruce con la línea transgénica Tg.RIP-Cre	118
5.2.3 Cruce con el modelo <i>Tie2</i> <sup>CreERT2</sup> : Aplicación al estudio de los vasos sanguíneos	119
5.3 Generación de un modelo con expresión ubicua y constitutiva de Katushka (Tg.CAG-Katushka)	122
5.3.1 Expresión de Katushka en células hematopoyéticas de la línea Tg.CAG-Katushka	122
5.3.2 Generación de la línea Tg.CAG-Katushka; <i>Foxn1</i> <sup>nu</sup>	124
5.3.3 Visualización de la vasculatura sanguínea en órganos específicos	126
<b>Discusión</b>	<b>124</b>
1. Diseño y caracterización del modelo <i>Tie2</i> <sup>CreERT2</sup>	133
2. Análisis de la expresión de <i>Tie2</i>	135
2.1 Especificidad por el endotelio vascular sanguíneo	135
2.2 Expresión de <i>Tie2</i> en la vasculatura de la retina	137
2.3 Expresión de <i>Tie2</i> en células de linaje hematopoyético	138
2.4 Expresión de <i>Tie2</i> en otros tipos celulares	142
3. Inactivación de c-Met en el endotelio vascular sanguíneo	142
4. Diseño y caracterización del modelo Tg.CAG-LSL-Katushka	147
5. Aplicaciones derivadas de la expresión de Katushka	148
<b>Conclusiones</b>	<b>153</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>157</b>
<b>Anexos</b>	<b>171</b>

---

# **RESUMEN / ABSTRACT**

---



La generación de nuevos vasos sanguíneos es una capacidad fisiológica vital que participa activamente en la patogenia de muchas enfermedades, entre ellas el cáncer. La modulación de la homeostasis vascular depende en gran medida de las células endoteliales, que regulan no sólo el crecimiento de los nuevos vasos sino también las funciones de barrera y los mecanismos de respuesta vascular. La identificación de genes asociados al fenotipo endotelial ha permitido la generación de herramientas para su estudio y a partir de ello, un análisis más específico de sus funciones. Uno de estos genes es *Tie2* que codifica para un receptor de angiopoietinas con actividad tirosina quinasa.

Mediante *gene targeting* por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón, se ha generado un modelo *knockin* (*Tie2*<sup>CreERT2</sup>) que expresa la recombinasa Cre inducible por tamoxifeno CreERT2 bajo la regulación transcripcional endógena del gen *Tie2*. A través del cruce con una línea trazadora de la actividad de Cre (*Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>) se comprobó que el modelo es capaz de inducir la recombinación de secuencias genéticas específicamente en las células endoteliales. Los resultados obtenidos validan este sistema como una excelente herramienta para la modificación condicional de genes en el endotelio vascular sanguíneo y en consecuencia para el estudio genético de los mecanismos moleculares que gobiernan la respuesta vascular. Adicionalmente, la caracterización del modelo ha permitido estudiar el patrón de expresión de *Tie2* durante la neovascularización fisiológica asociada al desarrollo embrionario y la angiogénesis retinal y durante la quiescencia vascular en el organismo adulto.

La vía de señalización mediada por HGF/c-Met es relevante en la progresión tumoral incluyendo el desarrollo de metástasis y la neovascularización. Algunos inhibidores de c-Met han demostrado actividad antitumoral y antiangiogénica por lo que resulta importante conocer las funciones específicas de dicho receptor en las células endoteliales. Mediante cruzamiento del modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> con una línea *knockout* condicional de c-Met, se estudió la contribución de la actividad tirosina quinasa de dicho receptor a la transmisión de señales capaces de modular la respuesta angiogénica del endotelio vascular sanguíneo. Los resultados obtenidos sugieren que la señalización mediada por la fosforilación de c-Met en las células endoteliales es prescindible y que no juega un papel fundamental en el control de la neovascularización asociada a procesos como el desarrollo embrionario, gestación, regeneración tisular, inflamación o carcinogénesis. Adicionalmente, se demuestra que la inactivación de c-Met no interfiere con los mecanismos de reclutamiento y extravasación de células inflamatorias en contextos patológicos.

Por otra parte, hemos generado un modelo transgénico (Tg.CAG-LSL-Katushka) que expresa la proteína roja fluorescente Katushka, bajo el control del promotor ubicuo CAG, exclusivamente tras eventos de recombinación mediados por Cre. Mediante el cruce con diversas líneas transgénicas que expresan Cre de forma ubicua o tejido-específica se ha demostrado la idoneidad de este modelo para detectar, incluso mediante técnicas de imagen no invasivas en el animal completo, aquellas poblaciones celulares en las que ha ocurrido recombinación mediada por Cre. Esta línea trazadora en conjunto con el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> permite el marcaje fluorescente y visualización del endotelio vascular además de facilitar la identificación de células hematopoyéticas que expresan *Tie2*.

Adicionalmente, tras recombinación del alelo Tg.CAG-LSL-Katushka en la línea germinal, se estableció un modelo murino con expresión constitutiva y ubicua de Katushka. Estos ratones constituyen una herramienta valiosa para el trazado de linajes ya que representan una fuente biológica de células fluorescentes de fácil detección, capaces de transmitir dicha característica identificativa a toda su descendencia. Además, éste modelo permite, mediante la adquisición de fluorescencia nativa por microscopía confocal, la visualización detallada de la vasculatura de la retina y la piel del pabellón auricular, dos sistemas de análisis ampliamente utilizados en el estudio de la biología vascular. Finalmente, tras el cruce con ratones atímicos desnudos *Foxn1*<sup>nu</sup>, se generó una línea receptiva a la implantación de tumores por xenotransplante; dicho modelo, en virtud de su emisión de fluorescencia, posibilita la fehaciente identificación de células del hospedero en el microambiente del tumor y permite visualizar las interacciones en el estroma con especial atención a la neovascularización tumoral.

The generation of new blood vessels is a physiologic ability deeply involved in the pathogenesis of different and important diseases such as cancer. Vascular homeostasis regulation depends on the endothelial cells, which control not only the growth of new vascular structures but also the barrier function and the mechanisms that govern vascular responses. The identification of genes which are reliable markers of the endothelial phenotype has allowed the generation of genetic tools for its study and a more specific analysis of its functions. One of these genes is *Tie2*, which codes for an angiopoietin receptor with tyrosine kinase activity.

We have generated a knockin *Tie2*<sup>CreERT2</sup> mouse model that expresses the tamoxifen-inducible Cre recombinase CreERT2 under the transcriptional control of the endogenous regulatory sequences of *Tie2*, after gene targeting by homologous recombination in murine ES cells. Using a Cre-reporter line (*Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>) we have shown that the knockin model drives efficient and inducible recombination of floxed sequences specifically in endothelial cells. The results obtained show that this system as an excellent tool for conditional modification of gene expression in the blood vascular endothelium and thus for the genetic dissection of the molecular mechanisms that control vascular responses. Additionally, the characterization of this model has allowed the study of the expression pattern of *Tie2* during physiologic neovascularization related to embryonic development and retinal angiogenesis and during vascular quiescence in the adult organism.

HGF/c-Met is an important signalling pathway involved in cancer progression, metastasis and tumor neovascularization. Some inhibitors of c-Met have proven anti-tumoral and anti-angiogenic activities, yet the specific roles of c-Met on endothelial cell biology are still unknown. To assess the *in vivo* contribution of the tyrosine kinase activity of c-Met in the transmission of signals capable of modulating the angiogenic response of the blood vascular endothelium, we crossed our *Tie2*<sup>CreERT2</sup> knockin mice with a conditional knockout model for *c-Met* in which Cre-mediated recombination drives c-Met kinase inactivation. The results obtained suggest that signalling by c-Met phosphorylation in endothelial cells is dispensable and does not play a fundamental role in the control of neovascularization related to events such as embryonic development, gestation, tissue regeneration, inflammation or carcinogenesis. Moreover, we have shown that the inactivation of c-Met does not affect the endothelium-based mechanisms for recruitment and extravasation of inflammatory cells to injured tissues.

In parallel, we have generated a transgenic model (Tg.CAG-LSL-Katushka) in which the red fluorescent protein Katushka is expressed, under the ubiquitous promoter CAG, exclusively after Cre-mediated recombination. Matings with different transgenic lines expressing Cre recombinase have shown the ability of this reporter model to track, even by non invasive whole-body imaging, recombined cellular populations. In combination with the *Tie2*<sup>CreERT2</sup> model, this line allows fluorescent labelling and visualization of endothelial cells besides facilitating the detection and identification of haematopoietic cells expressing *Tie2*.

Additionally, after germ-line recombination of the reporter allele, a murine model with constitutive and ubiquitous expression of Katushka has been established (Tg.CAG-Katushka). These mice are a valuable source of fluorescent-labelled cells which are easy to detect and capable of transmitting that identifying characteristic to all their descendants. Moreover, this model allows detailed visualization of the retinal and ear-skin vasculature, two widely used systems for the analysis of vascular biology, through confocal microscopy of native fluorescence. Finally, we have introduced this reporter into a nude background by mating Tg.CAG-Katushka mice with *Foxn1*<sup>nu</sup> animals; this strain allows tumor implantation by xenograft assays and reliable detection of host-derived cells in the tumor microenvironment by their fluorescence emission. Therefore, this model enables visualization and analysis of the tumor stroma and represents a potential asset to image and study the tumor vasculature.



---

# ABREVIATURAS

---



3'UTR.....	Región 3' no traducida ( <i>3' untranslated region</i> )
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ADNc.....	ADN complementario
Ang 1, 2, 3.....	Angiopietinas 1, 2 y 3
APC.....	Alofococianina ( <i>allophycocyanin</i> )
ARNm.....	Ácido ribonucleico mensajero
ATP.....	Adenosina trifosfato ( <i>adenosine triphosphate</i> )
bFGF.....	Factor de crecimiento de fibroblastos básico ( <i>basic fibroblast growth factor</i> )
BAC.....	Cromosoma bacteriano artificial ( <i>bacterial artificial chromosome</i> )
Bad.....	Promotor apoptótico asociado a Bcl2 ( <i>Bcl2-associated death promoter</i> )
CAG.....	Promotor híbrido ( <i>CMV enhancer/chicken beta-actin/rabbit beta-globin</i> )
Células ES.....	Células madre embrionarias ( <i>embryonic stem cells</i> )
CFP.....	Proteína fluorescente cian ( <i>cyan fluorescent protein</i> )
CMV.....	Citomegalovirus
DAPI.....	4',6-diamino-2-fenilindol ( <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> )
DMBA.....	7,12 dimetilbenzo[a]antraceno
DMEM.....	Medio de Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )
DTA.....	Toxina diftérica-α ( <i>diphtheria toxin alpha</i> )
EDTA.....	Ácido etilendiaminetetraacético
EGTA.....	Ácido etilenglicoltetraacético
EGF.....	Factor de crecimiento epidérmico ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGFP.....	Proteína verde fluorescente mejorada ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
eNOS.....	Óxido nítrico sintasa endotelial ( <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )
ERT.....	Receptor de estrógeno activado por tamoxifeno ( <i>estrogen receptor tamoxifen-activated</i> )
Erk.....	Quinasas reguladas por señales extracelulares ( <i>extracellular signal-regulated kinases</i> )
FAK.....	Quinasa de adhesión focal ( <i>focal adhesion kinase</i> )
FITC.....	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>fluorescein isothiocyanate</i> )
fl.....	Secuencia flanqueada por sitios loxP ( <i>flxed</i> )
frt.....	Sitio de reconocimiento de Flp ( <i>Flp recombination target</i> )
Gab1.....	Proteína de unión 1 asociada a Grb2 ( <i>Grb2-associated binder 1</i> )
GFP.....	Proteína verde fluorescente ( <i>green fluorescent protein</i> )
Grb2.....	Proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento ( <i>growth factor receptor-bound protein 2</i> )
HE.....	Hematoxilina-eosina
HEPES.....	Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1Piperazineetanosulfónico
HGF.....	Factor de crecimiento de hepatocitos ( <i>hepatocyte growth factor</i> )
HIF.....	Factor inducible por hipoxia ( <i>hypoxia-inducible factor</i> )
Hsp90.....	Proteína de choque térmico 90 ( <i>heat shock protein 90</i> )
ICAM-1.....	Molécula de adhesión intercelular 1 ( <i>intercellular adhesion molecule-1</i> )
ICM.....	Masa celular interna ( <i>inner cell mass</i> )
IFN-γ.....	Interferón-γ
IL.....	Interleuquina
IP.....	Intraperitoneal
IRES.....	Sitio de entrada interna de ribosoma ( <i>internal ribosome entry site</i> )
KI.....	knockin
loxP.....	Sitio de cruzamiento (x) en P1 ( <i>locus of crossover (x) in P1</i> )

LIF.....	Factor inhibidor de diferenciación derivado de la leucemia ( <i>leukemia inhibitory factor</i> )
LSL.....	.....loxP-STOP-loxP
Lyve1.....	Receptor de ácido hialurónico de vasos linfáticos 1 ( <i>lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i> )
Mapk.....	Proteína quinasa activada por mitógenos ( <i>mitogen activated protein kinase</i> )
MEFs.....	Fibroblastos embrionarios murinos ( <i>murine embryonic fibroblasts</i> )
mRFP1.....	Proteína roja fluorescente monomérica 1 ( <i>monomeric red fluorescent protein 1</i> )
MSP.....	Proteína estimulante de macrófagos ( <i>macrophage stimulating protein</i> )
Neo.....	.....Neomicina fosfotransferasa
Nck.....	Proteína adaptadora 1 de región no catalítica de tirosina quinasa ( <i>non-catalytic region of tyrosine kinase</i> )
NFR.....	Factor de tinción nuclear rojo ( <i>nuclear fast red</i> )
OCT.....	Compuesto crioprotector ( <i>optimal cutting temperature compound</i> )
PAC.....	Cromosoma artificial de fago ( <i>phage artificial chromosome</i> )
PAGE.....	Electroforesis en gel de poliacrilamida ( <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
PAK.....	Quinasa activada por p21 ( <i>p21-activated kinase</i> )
PBS.....	Tampón fosfato salino ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Pdgfb.....	Factor de crecimiento B derivado de plaquetas ( <i>platelet derived growth factor b</i> )
PE.....	Ficoeritrina ( <i>phycoerythrin</i> )
PE-Cy7.....	Ficoeritrina – cianina 7 ( <i>phycoerythrin-cyanine 7</i> )
PFA.....	.....Paraformaldehído
PGK.....	Fosfogliceratoquinasa ( <i>phosphoglycerate kinase</i> )
PI3K.....	Fosfatidilinositol 3 quinasa ( <i>phosphatidylinositol 3 kinase</i> )
PKB.....	Proteína quinasa B ( <i>protein kinase B</i> )
RFP.....	Proteína fluorescente roja ( <i>red fluorescent protein</i> )
RIP2.....	Promotor del gen insulina-2 de rata ( <i>rat insulin promoter 2</i> )
ROI.....	Región de interés ( <i>region of interest</i> )
SA.....	Sitio aceptor de <i>splicing</i> ( <i>splicing acceptor</i> )
SCL.....	Factor de transcripción SCL ( <i>stem cell leukemia</i> )
SDS.....	Dodecil sulfato de sodio ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SEM.....	Error estándar de la media ( <i>standard error of the mean</i> )
Tie.....	Tirosina quinasa con dominios de homología a la inmunoglobulina y a EGF ( <i>Tyr kinase with Ig and EGF homology domains</i> )
TNF-α.....	Factor de necrosis tumoral α ( <i>tumoral necrosis factor α</i> )
TPA.....	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato ( <i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i> )
VEGF.....	Factor de crecimiento vascular endotelial ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VEGF-R1, R2, R3.....	Receptores 1, 2 y 3 de VEGF
X-gal.....	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galacto-piranósido

---

# INTRODUCCIÓN

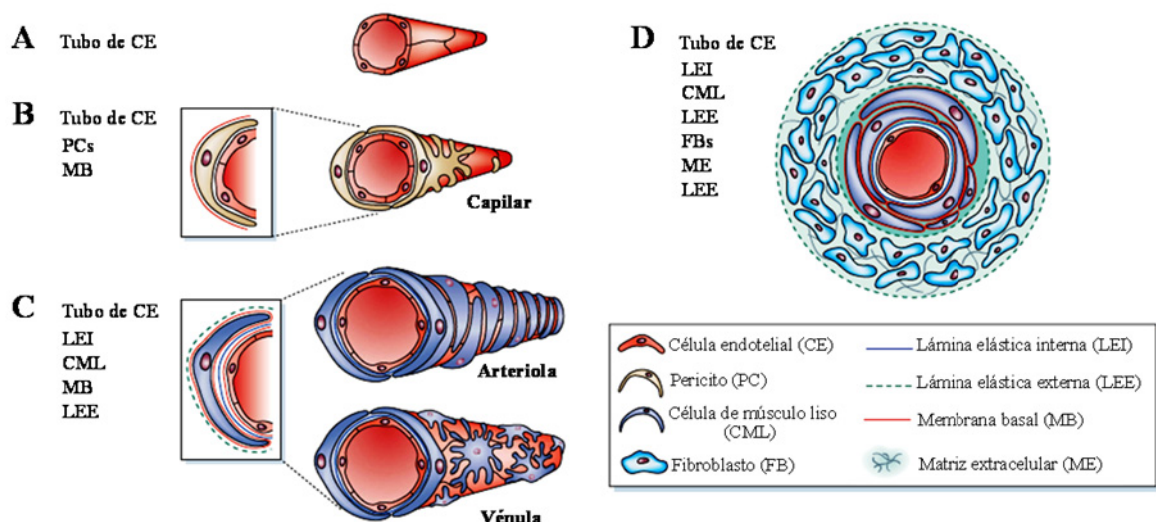
---



## 1. Estructura y función de los vasos sanguíneos

El sistema vascular sanguíneo surge en los organismos multicelulares con el fin de llevar oxígeno y nutrientes a órganos distantes y eliminar los desechos metabólicos de las células (Carmeliet, 2005). La complejidad estructural de los organismos vertebrados requiere el transporte eficiente y simultáneo de gases, líquidos, nutrientes, moléculas de señalización y células circulantes entre los tejidos (Adams and Alitalo, 2007). Adicionalmente, las células de los mamíferos dependen del metabolismo aeróbico para la generación de energía y por tanto requieren la presencia de capilares sanguíneos en su entorno más próximo, a una distancia máxima de 100 a 200  $\mu\text{m}$  que equivale al límite de difusión del oxígeno en los tejidos (Naumov *et al.*, 2006). Dada su importancia, la aparición del sistema vascular es uno de los primeros eventos de la organogénesis embrionaria y participa no solo en la función nutricional sino también en la generación de señales morfogénicas que dirigen el desarrollo de otros sistemas y órganos (Augustin *et al.*, 2009).

El lumen de los vasos sanguíneos de los vertebrados está delimitado por la pared vascular que se compone de una monocapa de células endoteliales (endotelio vascular) y diversas células murales (pericitos o células de músculo liso) embebidas en la matriz extracelular (Jain, 2003). La composición de la pared vascular varía en función del tipo de vaso (Figura 1), siendo más compleja en aquellos de mayor calibre, y participa activamente en la regulación funcional del flujo sanguíneo, la extravasación y las respuestas vasculares.



**Figura 1. Composición de la pared de los vasos sanguíneos.** A. Los vasos sanguíneos nacientes consisten en una estructura tubular de células endoteliales; al madurar, dan origen a capilares, arterias y venas. B. La pared de los capilares posee una monocapa de células endoteliales rodeada por membrana basal y algunos pericitos. C. Las arteriolas y vénulas tienen una mayor cobertura de células murales. Las arteriolas precapilares están totalmente revestidas por células de músculo liso mientras que las vénulas postcapilares permiten la extravasación de macromoléculas y células. D. Las paredes de los grandes vasos poseen tres capas especializadas: íntima (células endoteliales), media (células de músculo liso) y adventicia (fibroblastos embebidos en matriz extracelular y lámina elástica). Figura adaptada de Jain, 2003.

Las células murales (pericitos en los vasos de menor calibre y células de músculo liso en aquellos de mayor calibre) son fundamentales para el establecimiento y maduración de los vasos sanguíneos ya que inhiben la proliferación y migración de las células endoteliales al tiempo que promueven su supervivencia, quiescencia y diferenciación. Además, participan en el control hemostático del flujo sanguíneo, en la regulación de la permeabilidad vascular y en la adquisición de funciones especializadas (Carmeliet, 2003; Carmeliet and Collen, 2000; Li *et al.*, 2005). Por su parte, la matriz extracelular provee los contactos necesarios entre las células endoteliales y los tejidos circundantes, regula la formación de nuevos vasos sanguíneos y produce factores que favorecen la maduración y estabilización de la vasculatura (Carmeliet, 2003).

## 2. Origen y relevancia del endotelio vascular

A lo largo del desarrollo evolutivo, el sistema cardiovascular se ha ido especializando y perfeccionando. En este sentido, una de las diferencias fundamentales entre el sistema circulatorio de los animales vertebrados respecto a aquel de los invertebrados es la presencia del endotelio: una capa adluminal continua de células epiteliales interconectadas por complejos de unión especializados (Muñoz-Chapuli *et al.*, 2005). Desde el punto de vista ontogenético aún persisten importantes incertidumbres en relación al origen y diferenciación de las células endoteliales. Al respecto se ha propuesto que éstas derivan del mesodermo a partir de un progenitor común al endotelio y las células sanguíneas llamado hemangioblasto (Choi *et al.*, 1998). Sin embargo, también se ha demostrado la existencia de progenitores endoteliales circulantes capaces de movilizarse desde la médula ósea e incorporarse a sitios de neovascularización activa (Asahara *et al.*, 1997). Por otra parte, se han identificado células madre embrionarias capaces de diferenciarse en células endoteliales y murales y reproducir el proceso de organización vascular (Yamashita *et al.*, 2000).

El endotelio vascular contribuye a las funciones defensivas mediante la expresión de moléculas de superficie reconocidas por las células del sistema inmunitario, facilitando su reclutamiento a los sitios de interés. Además, las células endoteliales participan en la regulación fina del flujo sanguíneo a través de la producción de óxido nítrico y su habilidad para adquirir un fenotipo migratorio es fundamental para la neovascularización controlada de tejidos durante el desarrollo embrionario. Así pues, la especialización de este tipo celular confiere al sistema circulatorio de los vertebrados una mayor eficacia y versatilidad (Muñoz-Chapuli *et al.*, 2005). Adicionalmente, las células endoteliales participan en la conformación de los nichos donde se establecen las poblaciones de células madre y en la generación de señales tróficas que promueven la morfogénesis de distintos órganos (Coultas *et al.*, 2005).

## 3. La formación de nuevos vasos sanguíneos

La formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización) es un proceso sumamente complejo que requiere un exquisito balance entre numerosas señales de estimulación e inhibición y



puede ocurrir a través de alguno(s) de los siguientes mecanismos: angiogénesis (formación de nuevos vasos por brotación de estructuras vasculares a partir del endotelio parental preformado), vasculogénesis (movilización y diferenciación de células madre endoteliales derivadas de la médula ósea o transdiferenciación de precursores no endoteliales), arteriogénesis (desarrollo de arterias con capa muscular en el contexto de una situación de isquemia o hipoxia) o crecimiento colateral (crecimiento expansivo de vasos preexistentes por formación de puentes colaterales entre redes arteriales) (Carmeliet, 2000, 2003; Moldovan, 2003).

### 3.1 Angiogénesis fisiológica

La angiogénesis se inicia con vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular en los vasos preexistentes, dichos procesos favorecen la extravasación de proteínas plasmáticas que forman un andamiaje provisional necesario para la migración de las células endoteliales. Para que las células endoteliales puedan migrar necesitan relajar sus contactos intercelulares con el soporte de las células murales; así pues, los vasos maduros deben ser desestabilizados gracias a la acción de numerosas proteinasas que degradan la matriz extracelular y liberan factores pro-angiogénicos. Una vez “aclarado el camino”, las células endoteliales proliferan y migran a sitios distantes guiadas por diversas moléculas de señalización (Carmeliet, 2000). Al principio, los vasos nacientes están delimitados únicamente por el endotelio vascular. A continuación, diversos factores angiogénicos y arteriogénicos favorecen que las uniones entre las células endoteliales se estrechen y que éstas sean recubiertas por células murales y matriz extracelular. El flujo sanguíneo participa activamente en dicho proceso favoreciendo la persistencia de los vasos recién formados y su especialización ulterior (Carmeliet, 2003).

Eventos metabólicos o mecánicos como la hipoxia, la escasez de nutrientes o variaciones en la presión hidrostática influyen decisivamente en la formación, maduración y remodelación de los vasos sanguíneos durante la angiogénesis fisiológica y patológica (Jain, 2003). La hipoxia es uno de los desencadenantes fundamentales de la angiogénesis a través de los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIFs) que favorecen la expresión de genes pro-angiogénicos (Carmeliet, 2003); adicionalmente, la hipoxia puede influir sobre reguladores maestros del metabolismo capaces de modular la respuesta angiogénica frente a alteraciones de la homeostasis metabólica (Fraisl *et al.*, 2008).

#### 3.1.1 Desarrollo del sistema vascular en la embriogénesis

La primera red vascular en el embrión se forma mediante vasculogénesis, proceso que consiste en la formación de células endoteliales por diferenciación *in situ* de células precursoras no diferenciadas derivadas del mesoderma (angioblastos). Dichas células endoteliales se asocian y, por coalescencia, generan un laberinto o plexo vascular primitivo formado por canales endoteliales de tamaño relativamente uniforme (Jones *et al.*, 2001; Risau and Flamme, 1995). A continuación, la red primitiva se expande mediante brotes que surgen a partir de los vasos preformados (angiogénesis) o por intususcepción de columnas tisulares intersticiales que se insertan en el lumen y dividen vasos

preexistentes (Carmeliet and Jain, 2000). Estos mecanismos dan lugar a una red vascular altamente organizada y jerarquizada con vasos de mayor calibre que se ramifican en otros más pequeños (Carmeliet, 2005). La remodelación y maduración del plexo vascular primitivo ocurre entre los días E9.5 y E12.5 del desarrollo embrionario y requiere el reclutamiento de células murales, la generación y desarrollo de la matriz extracelular, y la especialización órgano-específica de las células endoteliales y estructuras asociadas (Jain, 2003).

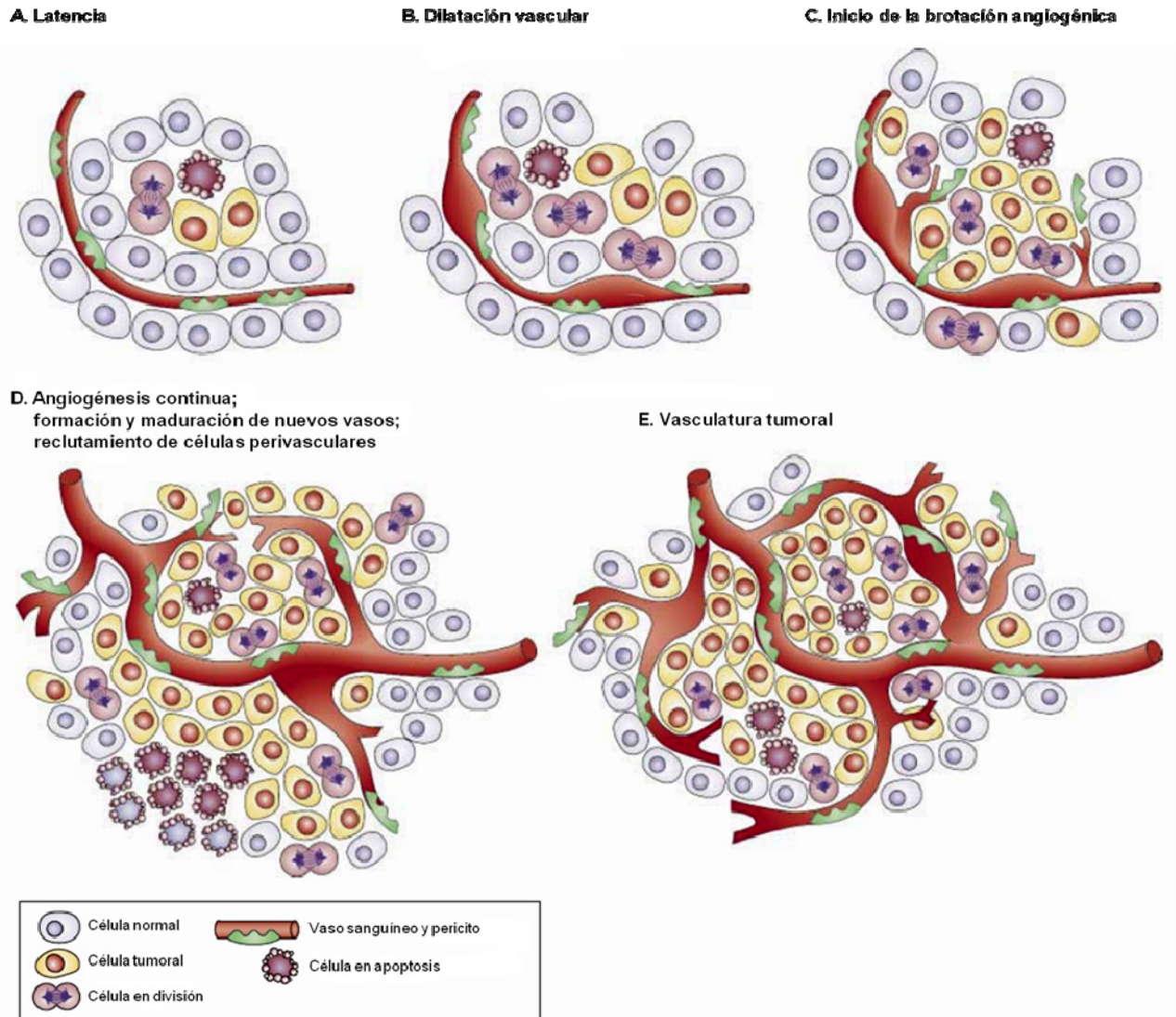
### 3.1.2 Neovascularización en el organismo adulto

En el organismo adulto apenas un 0.01% de las células endoteliales se encuentra en división (Carmeliet and Jain, 2000), sin embargo, el endotelio vascular conserva una gran habilidad para dividirse rápidamente en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos (Carmeliet, 2005). La angiogénesis fisiológica en el organismo adulto usualmente es focal, de duración limitada y suele estar asociada a procesos relacionados con la reproducción (ovulación, placentación y galactogénesis) y la reparación tisular (cicatrización de heridas y regeneración tisular) (Folkman, 2007a). Nuevas evidencias apuntan a que la angiogénesis también juega una función importante en la configuración del sistema nervioso y su protección de las enfermedades (Greenberg and Jin, 2005) y se han descrito importantes paralelismos entre las acciones de los factores de crecimiento angiogénicos y aquellos que regulan la arborización terminal de los axones (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005).

## 3.2 Angiogénesis tumoral

El concepto que establece un vínculo fundamental entre la angiogénesis y el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis fue propuesto hace más de cuarenta años (Folkman, 1971). A grandes rasgos establecía que los tumores sólidos sólo podrían crecer más allá de un diámetro reducido si eran capaces de estimular el desarrollo de un sistema vascular propio a partir de los vasos sanguíneos del organismo huésped. En ausencia de dicha red vascular las tasas de multiplicación y muerte celular en el tumor alcanzan un estado de equilibrio (latencia) y no es posible el crecimiento exponencial del mismo (Folkman, 1974).

Posteriormente se comprobó que la adquisición de un fenotipo angiogénico (Figura 2), también llamado “switch angiogénico”, es uno de los procesos esenciales que deben ocurrir para el desarrollo del cáncer (Bergers and Benjamin, 2003; Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Su importancia en la expansión tumoral es tal que la “adicción a oncogenes” podría estar mediada por el efecto pro-angiogénico de éstos; así pues, el incremento neto en la proliferación celular inducido por un oncogén activo no es suficiente para que el tumor crezca más allá de un tamaño microscópico a menos que dicho oncogén sea capaz de inducir la neovascularización tumoral (Folkman and Ryeom, 2005).



**Figura 2. El "switch angiogénico".** La adquisición del fenotipo angiogénico es un paso discreto en el desarrollo tumoral. La mayoría de los tumores comienzan a crecer como nódulos avasculares latentes en los que las tasas de proliferación y apoptosis se equiparan (A). La iniciación de la angiogénesis, previa vasodilatación y eliminación de células murales, permite el crecimiento exponencial del tumor (B). Mediante brotación angiogénica (C) se forman nuevos vasos cuya maduración implica el reclutamiento de células perivasculares (D). Los nuevos vasos establecen la vasculatura tumoral (E) responsable de la nutrición del tumor. Figura adaptada de Bergers and Benjamin, 2003.

La presentación del fenotipo angiogénico depende del balance neto entre los factores pro- y anti-angiogénicos liberados por el microambiente del tumor (Folkman, 1995). Dicho balance puede ser alterado por el estrés metabólico (hipoxia, hipoglicemia), el estrés mecánico (presión generada por células en proliferación), mutaciones genéticas (activación de oncogenes o inactivación de genes supresores de tumores) y la respuesta inmune-inflamatoria (Carmeliet and Jain, 2000). Al respecto, cabe destacar que la inflamación es un componente esencial en la promoción de la angiogénesis tumoral (Noonan *et al.*, 2007) y una de las mayores diferencias entre la angiogénesis fisiológica y patológica (Kobayashi and Lin, 2005).

La neovascularización no sólo es importante para la expansión tumoral, también influye decisivamente en el establecimiento y desarrollo de las metástasis. En tal sentido se ha propuesto que la mayoría de los patrones de presentación clínica de metástasis pueden estar determinados, al menos en parte, por las características angiogénicas de la vasculatura del tumor primario (Folkman, 1995). Así pues, algunos tumores primarios pueden inhibir el desarrollo de metástasis mediante la producción de agentes anti-angiogénicos sistémicos (Holmgren *et al.*, 1995), mientras que otros secretan al plasma proteínas que impiden la acción de los inhibidores endógenos de la angiogénesis, específicamente en fibroblastos y células endoteliales de futuros sitios de metástasis (Folkman, 2007b). La importancia de la angiogénesis tumoral en el proceso metastático ha sido puesta en evidencia en modelos de metástasis a ganglios linfáticos (Van den Eynden *et al.*, 2005) y órganos viscerales como pulmón e hígado (Fukata *et al.*, 2005; Mi *et al.*, 2006; Takahashi and Mai, 2005).

La vasculatura tumoral no sigue el patrón de ramificación jerárquico y organizado de las redes vasculares normales (Jain, 2003); sus vasos sanguíneos suelen ser tortuosos, dilatados, de diámetro variable y con excesivas ramificaciones (Carmeliet and Jain, 2000). En consecuencia, el flujo sanguíneo tumoral es caótico y poco eficiente en la satisfacción de la demanda metabólica, favoreciendo la generación de áreas de hipoxia y acidez (Helmlinger *et al.*, 1997). Estas condiciones disminuyen la efectividad terapéutica, modulan la producción de estimuladores e inhibidores angiogénicos y ejercen una presión selectiva a favor de las células cancerosas más malignas y metastáticas (Carmeliet and Jain, 2000). Además, las zonas hipóxicas o necróticas del tumor favorecen el reclutamiento de células inflamatorias (monocitos y macrófagos asociados a tumores) implicadas en el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la invasividad (Lewis and Murdoch, 2005).

Por su parte, la estructura de la pared vascular también es anormal: la expresión de moléculas de adhesión y marcadores de endotelio es heterogénea, en algunas zonas se pierde la integridad de la monocapa endotelial mientras que en otras se forman capas múltiples, la membrana basal es discontinua y las células endoteliales, además de ser propensas a la apoptosis, presentan fenestraciones o vesículas vacuolares y contienen agujeros inter y trans-celulares (Jain, 2003). Asimismo, las células tumorales pueden formar parte del endotelio de algunos vasos (mimetismo vasculogénico) (Barinaga, 1999; Chang *et al.*, 2000; Maniotis *et al.*, 1999; Shirakawa *et al.*, 2002) y su presencia puede tener una implicación significativa en el desarrollo de metástasis (Carmeliet & Jain, 2000).

La ruta de señalización mediada por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y sus receptores es esencial durante la vasculogénesis embrionaria y en la neovascularización fisiológica o patológica de los tejidos adultos. Sus rutas de señalización favorecen la supervivencia, proliferación, migración y reclutamiento de células endoteliales, además de incrementar la permeabilidad vascular y promover la disponibilidad de otros factores pro-angiogénicos (Byrne *et al.*, 2005; Coultas *et al.*, 2005). Dado que la señalización activada por VEGF constituye una de las principales vías de inducción de angiogénesis tumoral, numerosos agentes capaces de inhibir su función han sido desarrollados y validados en modelos animales y ensayos clínicos. Si bien algunos de estos inhibidores han demostrado

eficacia antitumoral, la aparición de resistencia adaptativa e incluso la progresión a estados de mayor malignidad e invasividad ha limitado considerablemente la potencial aplicación de estos agentes terapéuticos (Paez-Ribes *et al.*, 2009). Así pues, nuevos inhibidores de la angiogénesis están siendo desarrollados cuya acción se centra en mecanismos complementarios a los regulados por VEGF. En tal sentido, moléculas capaces de regular la ramificación, elongación, fusión, maduración y remodelación de la vasculatura son candidatos relevantes para combatir la angiogénesis tumoral y la resistencia a las terapias basadas en VEGF (Carmeliet *et al.*, 2009).

## 4. La ruta de señalización de HGF/c-Met

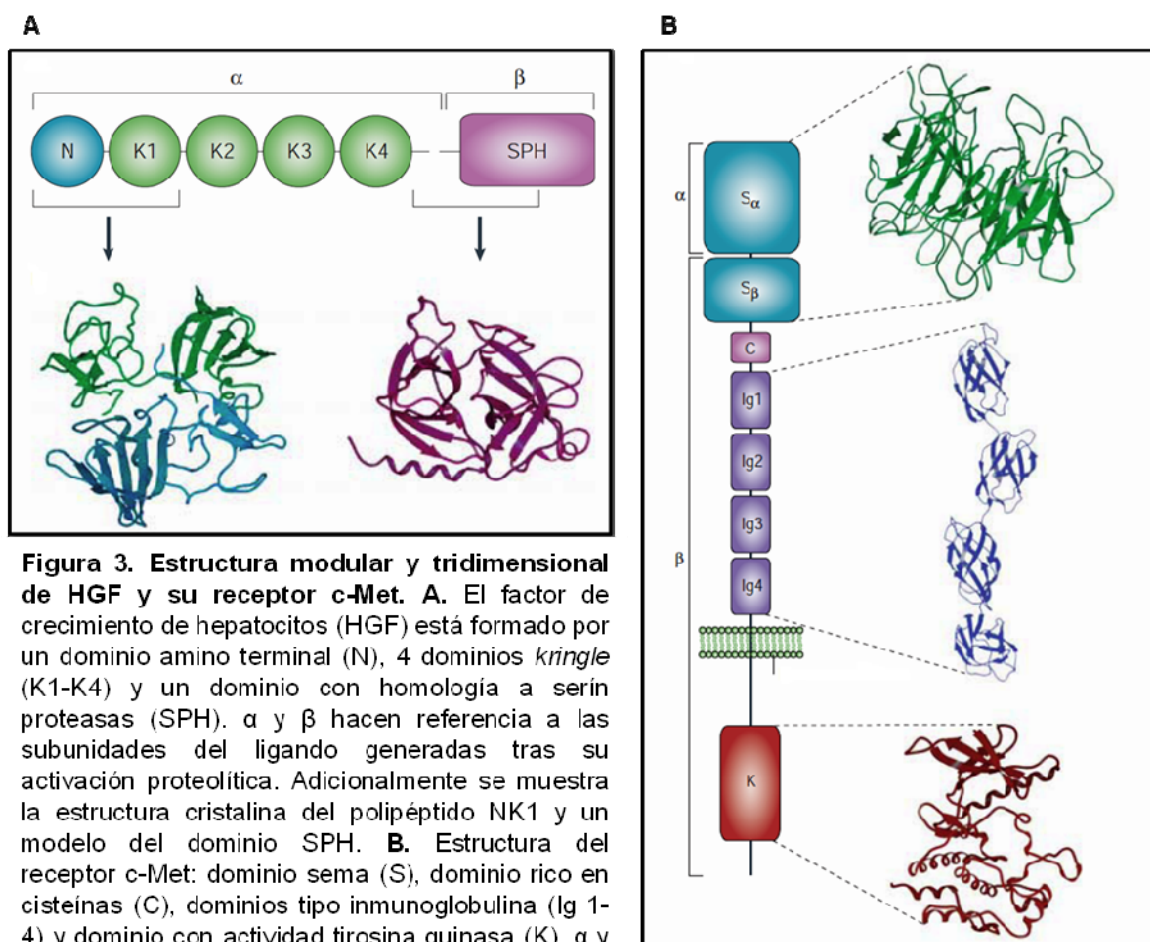
### 4.1 El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *hepatocyte growth factor*) es una glicoproteína secretada que actúa como una citoquina con actividades pleiotrópicas capaz de mediar señales que favorecen la migración, supervivencia y proliferación celular (Birchmeier *et al.*, 2003). La coordinación espacial y temporal de dichas actividades permite regular programas celulares complejos como la formación de estructuras tubulares ramificadas y el crecimiento invasivo, esta última de gran relevancia durante el desarrollo embrionario, la regeneración tisular y el establecimiento de metástasis (Trusolino and Comoglio, 2002).

HGF es producida predominantemente por células mesenquimales y es capaz de actuar de forma endocrina o paracrina sobre células que expresan el receptor c-Met (Ma *et al.*, 2003). HGF fue identificado originalmente como *scatter factor* (SF), un agente de origen fibroblástico capaz de inducir la movilidad y dispersión de las células epiteliales (Stoker *et al.*, 1987). Prácticamente en paralelo fue descrito un factor de crecimiento fundamental en la regeneración hepática en virtud de su acción mitógena sobre los hepatocitos (Nakamura *et al.*, 1989). Poco tiempo después se estableció que ambos agentes correspondían a una misma proteína (Gherardi and Stoker, 1990; Weidner *et al.*, 1991) capaz de estimular la proliferación y motilidad celular a través del receptor de membrana c-Met (Naldini *et al.*, 1991).

HGF es una proteína compleja que guarda similitud con el plasminógeno, al igual que éste es sintetizado como un precursor mayormente inactivo que es proteolíticamente activado por diversas serín proteasas (Schwall *et al.*, 1996). La forma activa de HGF es capaz de unirse a c-Met e inducir su dimerización y fosforilación, desencadenando una cascada de señalización intracelular que constituye la vía fundamental por la que HGF modula diferentes actividades biológicas (Birchmeier *et al.*, 2003). Adicionalmente, HGF se une con gran afinidad a proteoglicanos como heparán sulfato que limita la difusión *in vivo* de dicho factor aunque no es fundamental para la activación del receptor c-Met (Hartmann *et al.*, 1998).

Estructuralmente HGF se caracteriza por poseer una estructura modular organizada en seis dominios: un dominio amino-terminal (N), cuatro dominios *kringle* y un dominio con homología a serín proteasas (SPH) sin actividad enzimática (Figura 3). El precursor de HGF es sintetizado como una pro-proteína de cadena única que tras su procesamiento proteolítico da lugar a un heterodímero activo formado por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas por puentes disulfuro. La conversión del precursor inactivo en la forma biológicamente activa es efectuada por diversas serín proteasas que incluyen al activador del plasminógeno tisular, urokinasa y diversos factores de coagulación (Birchmeier *et al.*, 2003).



**Figura 3. Estructura modular y tridimensional de HGF y su receptor c-Met.** A. El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) está formado por un dominio amino terminal (N), 4 dominios *kringle* (K1-K4) y un dominio con homología a serín proteasas (SPH).  $\alpha$  y  $\beta$  hacen referencia a las subunidades del ligando generadas tras su activación proteolítica. Adicionalmente se muestra la estructura cristalina del polipéptido NK1 y un modelo del dominio SPH. B. Estructura del receptor c-Met: dominio sema (S), dominio rico en cisteínas (C), dominios tipo inmunoglobulina (Ig 1-4) y dominio con actividad tirosina quinasa (K).  $\alpha$  y  $\beta$  hacen referencia a las subunidades del receptor generadas tras su procesamiento proteolítico. Además se muestran modelos tridimensionales de los dominios sema, inmunoglobulina y quinasa.

La estructura modular de HGF ha facilitado el análisis de la función particular de sus dominios. (Gherardi *et al.*, 1997). Experimentos basados en la delección de dominios o en la expresión individual de éstos ha permitido establecer que el primer dominio *kringle* es capaz de unirse y activar el receptor c-Met, aunque requiere la presencia del dominio N-terminal (NK1) para unirse a proteoglicanos (Rubin *et al.*, 2001). Por su parte, la adición de los siguientes dominios *kringle* a NK1 modifica la acción biológica de los polipéptidos resultantes. Así pues, NK2, una variante natural de HGF constituida por el dominio N-terminal y los primeros dos dominios *kringle* antagoniza los efectos de HGF sobre el crecimiento celular *in vivo* pero facilita la motilidad celular (Otsuka *et al.*, 2000). Finalmente, NK4 ha demostrado ser capaz de unirse al receptor c-Met e inhibir diversas de las respuestas biológicas inducidas por HGF, incluyendo su capacidad angiogénica (Kuba *et al.*, 2000).

## 4.2 El receptor tirosina quinasa c-Met

Las funciones de HGF son mediadas por el receptor c-Met, el cual es un receptor de la membrana celular con actividad tirosina quinasa y que se expresa fundamentalmente en células epiteliales y endoteliales (Kuhnen *et al.*, 2003). La primera descripción de c-Met hacía referencia a un oncogén activado presente en una línea celular de osteosarcoma (Cooper *et al.*, 1984); posteriormente, la identificación del proto-oncogén permitió la descripción de c-Met como un receptor con actividad tirosina quinasa (Park *et al.*, 1987) sin que se conociese en ese momento la identidad de sus ligandos.

Al igual que su ligando, el receptor c-Met es un heterodímero unido por puentes disulfuro que se forma tras la digestión proteolítica de un precursor. La forma madura del receptor consiste de una subunidad  $\alpha$  íntegramente extracelular y una subunidad  $\beta$ , de mayor tamaño, que engloba el resto del ectodominio de c-Met, la hélice transmembrana y la porción citoplásmica del receptor, donde se encuentra el dominio con actividad tirosina quinasa y la región C terminal, esencial para el reclutamiento de diversos sustratos. La estructura de c-Met (Figura 3) está conformada por un dominio Sema típico de las proteínas semaforinas que es capaz por sí mismo de unirse a HGF, un pequeño dominio rico en cisteínas seguido por cuatro repeticiones de dominio tipo inmunoglobulinas y el dominio tirosina quinasa intracelular (Gherardi *et al.*, 2003).

El receptor c-Met es el prototipo de una familia de receptores con actividad tirosina quinasa en la que también se encuentra el receptor Ron, cuyo ligando es la proteína estimulante de macrófagos (MSP) (Follenzi *et al.*, 2000). Estructuralmente se caracterizan por poseer dos residuos adyacentes de tirosina en el dominio quinasa de la subunidad  $\beta$ , responsables de la actividad catalítica del receptor y dos residuos de tirosina en la región C-terminal de la subunidad  $\beta$  que actúan como un sitio de unión multifuncional que recluta con gran afinidad diversos mediadores intracelulares (Gherardi *et al.*, 2006).

## 4.3 Señalización intracelular mediada por c-Met

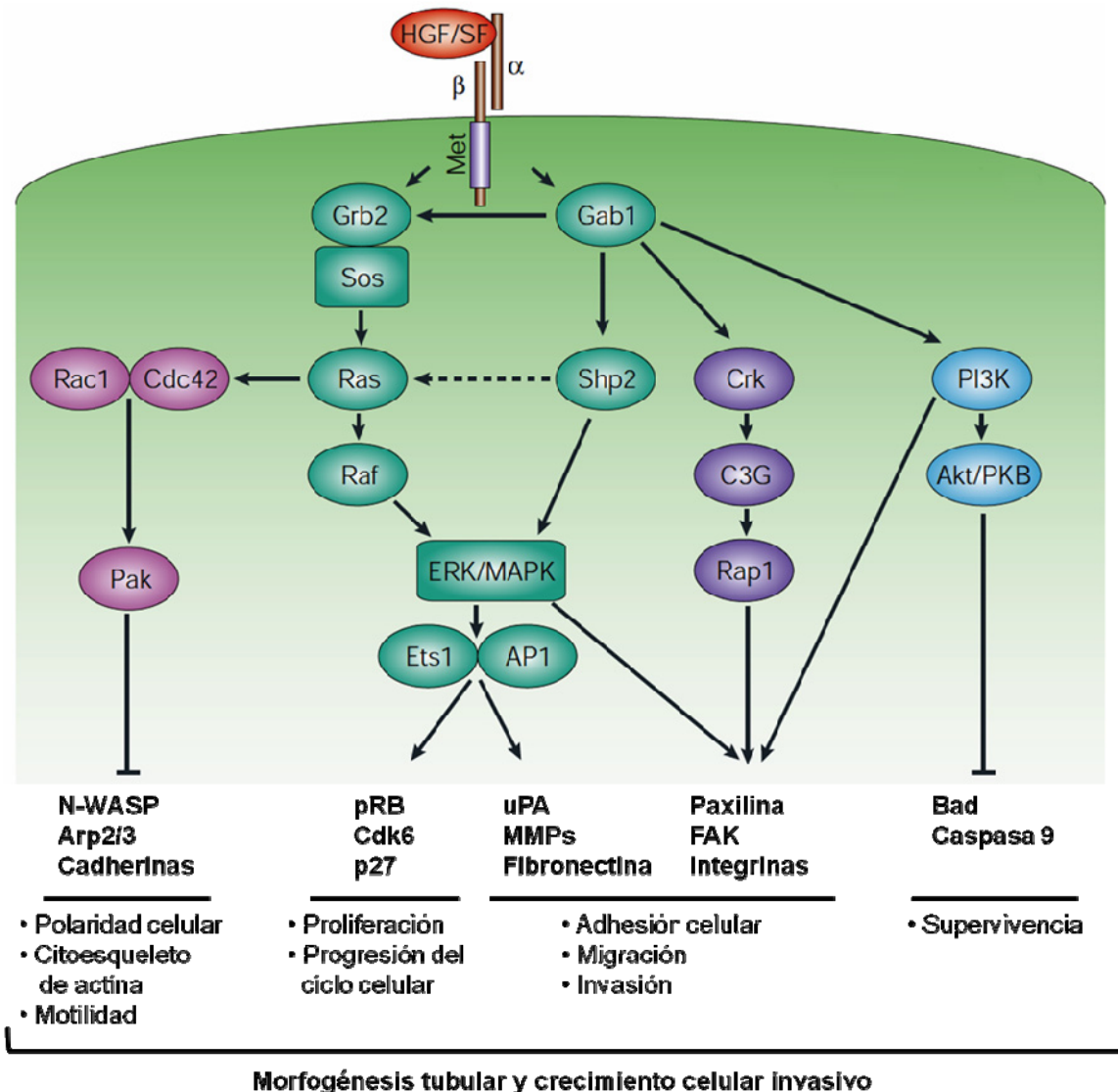
La región N terminal de HGF se une a c-Met induciendo la dimerización y fosforilación de las tirosinas 1230, 1234 y 1235 del dominio quinasa que a su vez determinan la autofosforilación de las tirosinas 1349 y 1356 del dominio C-terminal (Gherardi *et al.*, 2006). De esta manera se genera un sitio de unión multifuncional que recluta diversas proteínas adaptadoras responsables de la transmisión de señales intracelulares a través de las vías de Ras/Mapk, PI3K/Akt, c-Src y STAT3/5 (Peruzzi and Bottaro, 2006).

Diversos ensayos genéticos y biológicos han demostrado que Gab1 es el sustrato más relevante en la transmisión de señales a través del eje HGF/c-Met (Sachs *et al.*, 2000). Gab1 es una proteína adaptadora que es reclutada directa e indirectamente al dominio tirosina quinasa activado. La interacción directa se da a través de una secuencia de 13 aminoácidos en Gab1 (el sitio de unión a c-Met) que es



distinta a los dominios clásicos de unión a fosfo-tirosinas y que no está presente en otras proteínas de la familia Gab (Lock *et al.*, 2000). Dicha interacción determina la fosforilación de Gab1 y el consecuente reclutamiento de diversas moléculas de señalización como Shp2, Grb2, PI3K, fosfolipasa C y Crk, a través de sus dominios SH2 (Gu and Neel, 2003).

La señalización intracelular mediada por c-Met (Figura 4) determina la ejecución de respuestas celulares características que dependen del tipo celular y de las rutas de señalización activadas.



**Figura 4. Señalización intracelular mediada por HGF/c-Met.** La activación de c-Met determina el reclutamiento de proteínas como Gab1 y Grb2 que activan a Shp2, Ras y la ruta de Erk/Mapk. En consecuencia se producen cambios en la expresión de genes reguladores de ciclo celular (como la Retinoblastoma -pRb-, Cdk6 y p27) y proteinasas de la matriz extracelular (como metaloproteinasa de la matriz -MMPs- y urokinasa -uPA-) así como alteraciones en el citoesqueleto que controlan la migración, invasión y proliferación. En este sentido, la activación de Ras-Rac1/Cdc42-PAK y Gab1-Crk-C3G-Rap1 participan en la regulación del citoesqueleto y en la función de moléculas de adhesión como las cadherinas, Arp2/3, N-WASP, paxilina, integrinas y la quinasa de adhesión focal (FAK). Por su parte, la activación de Gab1-PI3K-Akt/PKB controla la supervivencia celular a través de la inhibición de caspasa-9 y Bad. Figura adaptada de Birchmeier *et al.*, 2003.



Grandes esfuerzos se han dedicado a definir el rol de determinados efectores intracelulares en la mediación de respuestas específicas mediante el uso de inhibidores selectivos. En tal sentido, se ha propuesto que la cascada de señalización mediada por Gab1-Shp2-Erk/Mapk regula la proliferación, adhesión y motilidad celular. Por su parte, Ras, Rac1 y PAK modulan la organización del citoesqueleto y la adhesión celular. Igualmente, la señalización de Gab1 y Crk a través de Rap1 participa también en el control de la motilidad celular. Además, la señalización a través de PI3K, Akt y la proteína quinasa B (PKB) promueven la supervivencia celular mientras que Ras/Mapk favorecen la proliferación celular y la adquisición de características asociadas a la transformación oncogénica (Birchmeier *et al.*, 2003). Finalmente, cabe destacar que el control de procesos morfogénicos complejos, como el crecimiento celular invasivo y la formación de estructuras tubulares, requiere la participación de toda la maquinaria de transducción de señales para regular coordinadamente el crecimiento celular, la polaridad celular y el movimiento (Porter, 2010).

Por otra parte, existen evidencias que indican que c-Met puede interactuar en la membrana celular con integrina- $\beta_4$  (Trusolino *et al.*, 2001), ezrina (Crepaldi *et al.*, 1997), cadherina-E (Hiscox and Jiang, 1999), ICAM-1 (Olaku *et al.*, 2011), neuropilina 1 y 2 (Sulpice *et al.*, 2008), CD44 (Orian-Rousseau *et al.*, 2002) o los receptores de semaforinas (Giordano *et al.*, 2002) y de Fas (Wang *et al.*, 2002), formando distintas plataformas de señalización. Dichas interacciones participan en la regulación de diversos procesos biológicos mediante la relocalización de c-Met a regiones especializadas de la membrana celular y favoreciendo su agrupación con sustratos específicos o con otras moléculas de señalización intracelular.

#### 4.4 Funciones fisiológicas de HGF/c-Met

Los ratones *knockout* para HGF (Schmidt *et al.*, 1995) o c-Met (Bladt *et al.*, 1995), o aquellos portadores de mutaciones inactivantes en dicho receptor presentan un fenotipo letal embrionario debido a defectos en la placenta, hígado, músculo y sistema nervioso (Maina *et al.*, 1996; Maina *et al.*, 1997; Maina *et al.*, 2001). Durante el desarrollo embrionario, c-Met controla la transición epitelio-mesénquima de progenitores miogénicos y la migración de los mismos a sitios distantes del embrión. Dichos mecanismos son empleados también por las células tumorales en su proceso de colonización metastática.

En el organismo adulto la vía de señalización mediada por HGF/c-Met ha sido asociada al control de la homeostasis tisular y la protección frente a enfermedades degenerativas; de hecho, se cree que la regulación al alza de HGF y la consecuente activación de c-Met puede ser parte de un mecanismo defensivo general contra diversas lesiones tisulares (Comoglio *et al.*, 2008). En tal sentido, mediante el empleo de un modelo *knockout* condicional de c-Met específico de hepatocitos se ha demostrado que la pérdida de la actividad tirosina quinasa de c-Met no afecta la función de dichas células en condiciones fisiológicas, sin embargo, la respuesta adaptativa al daño hepático se encuentra altamente comprometida (Huh *et al.*, 2004).

Otros estudios han demostrado que c-Met es esencial para la reparación de heridas en ratones; así pues la delección condicional de c-Met en los queratinocitos impide la contribución de dicho linaje celular al proceso de regeneración tisular. Además, otros factores de crecimiento involucrados en la re-epitelización, como EGF y FGF, no son capaces de compensar *in vivo* la falta de HGF/c-Met en la piel (Chmielowiec *et al.*, 2007).

### 4.5 Funciones de HGF/c-Met en la progresión tumoral

La sobreexpresión de HGF y c-Met ha demostrado ser capaz de inducir la transformación oncogénica de líneas celulares de ratón e inducir su capacidad invasiva y metastática. De forma similar, la inactivación o silenciamiento de HGF o c-Met en líneas celulares tumorigénicas, disminuye considerablemente su potencial neoplásico (Jeffers *et al.*, 1996).

La señalización a través de HGF/c-Met es importante en el desarrollo tumoral, particularmente en las etapas invasivas y metastáticas (Comoglio and Trusolino, 2002) y contribuye activamente a los procesos de proliferación, invasión, angiogénesis y escape de la apoptosis (Birchmeier *et al.*, 2003). La presencia de altos niveles de HGF y la sobreexpresión de c-Met en el cáncer han sido asociadas a pronóstico desfavorable, agresividad de la enfermedad, incremento en la aparición de metástasis y disminución de la tasa de supervivencia (Birchmeier *et al.*, 2003; Comoglio and Trusolino, 2002; Danilkovitch-Miagkova and Zbar, 2002).

La activación aberrante de la ruta de señalización mediada por HGF/c-Met ha sido asociada a la presentación de distintos tumores primarios en estómago, esófago, riñón, hígado, tiroides, ovarios, páncreas, próstata, colon, glándula mamaria y sistema nervioso central (Comoglio *et al.*, 2008). De hecho, la sobreexpresión condicional de c-Met específicamente en los hepatocitos de ratones transgénicos es capaz, por sí sola, de inducir la aparición de carcinomas hepatocelulares que remiten tras la inactivación del transgén (Wang *et al.*, 2001). Dada la abundancia y solidez de las evidencias que relacionan la vía de señalización mediada por HGF/c-Met con varios tipos de cáncer, grandes esfuerzos se han dedicado al desarrollo de agentes terapéuticos capaces de bloquear sus efectos en la promoción de la progresión tumoral y la invasividad (Porter, 2010).

### 4.6 Participación de HGF/c-Met en la angiogénesis

HGF estimula la proliferación y migración de diversos tipos de células epiteliales y endoteliales (Zarnegar and Michalopoulos, 1995) y es reconocido como uno de los factores de crecimiento capaces de modular la angiogénesis (Peters *et al.*, 2004). Al mismo tiempo, existe evidencia que relaciona la señalización a través de c-Met con procesos íntimamente asociados a la neovascularización (Chmielowiec *et al.*, 2007; Kuhnen *et al.*, 2003; Neuss *et al.*, 2004). Por ejemplo, la administración exógena de HGF a ratones de genotipo silvestre es capaz de promover la cicatrización mediante la

estimulación de la migración de células endoteliales al área afectada y su proliferación (Bevan *et al.*, 2004). De forma similar, la expresión transgénica de HGF en la piel del ratón promueve la formación de vasos linfáticos con gran eficacia (Kajiya *et al.*, 2005). Además, los mecanismos de señalización autocrinos y paracrinos de HGF sobre c-Met constituyen un fuerte estímulo para la neovascularización tumoral (Kuhnen *et al.*, 2003) y contribuyen a la expresión de otros factores angiogénicos por parte de las células tumorales (Dong *et al.*, 2004). Al mismo tiempo, la administración de inhibidores competitivos de c-Met es capaz de impedir el crecimiento tumoral a través de la disminución de la densidad microvascular y la atenuación del fenotipo angiogénico (Puri *et al.*, 2007). Por otra parte, algunos resultados sugieren que HGF y c-Met son sobreexpresados durante la neovascularización de la retina inducida por hipoxia y que c-Met en particular es expresado por las células vasculares; al respecto, la inhibición de c-Met mediante la inyección intraocular de un anticuerpo anti-c-Met provoca un marcado descenso en la angiogénesis retinal asociado a una menor actividad de urokinasa, proteasa de la matriz extracelular que participa activamente en la promoción de la motilidad celular (Colombo *et al.*, 2007).

Aún se desconoce si la activación de c-Met en las células endoteliales mediada por HGF contribuye o no a la angiogénesis tumoral *in vivo*, aunque existen evidencias que apuntan en esa dirección. Por una parte se sabe que HGF induce la expresión de VEGF en diferentes líneas celulares (Pennacchietti *et al.*, 2003) y a su vez que HGF promueve el crecimiento, supervivencia y motilidad de las células endoteliales en cultivo (Ma *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Además, en ensayos de xenotransplante de células tumorales que sobreexpresan HGF, se ha demostrado que el crecimiento y la angiogénesis tumoral pueden ser inhibidos mediante expresión simultánea de un antagonista de HGF (NK4) o de un receptor c-Met soluble (Kubota *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren claramente una función de c-Met en los procesos de neovascularización fisiológica y tumoral, sin embargo, es necesario esclarecer si dicho papel está asociado directamente a las rutas de señalización activadas en las células endoteliales y en qué medida contribuyen éstas a la acción definitiva de c-Met sobre el proceso global. Más aún, la disección detallada de las funciones del eje HGF/c-Met en las células endoteliales, tanto durante el desarrollo como en el contexto del crecimiento tumoral, podría dar lugar a la validación de esta ruta de señalización como un objetivo potencial de las terapias antiangiogénicas.

Otras líneas de evidencia apuntan a un rol de c-Met en la adquisición de resistencia a los tratamientos anti-angiogénicos; en tal sentido su inhibición terapéutica en conjunto con fármacos capaces de inhibir otras vías de señalización como VEGF constituye una estrategia capaz de mejorar la eficacia de los inhibidores angiogénicos en diversos tipos de cáncer (Aftab and McDonald, 2011). Al respecto, cabe destacar que la hipoxia es capaz de inducir un incremento en la transcripción de c-Met (Pennacchietti *et al.*, 2003), que a su vez estimula la capacidad invasiva de las células favoreciendo su migración a zonas con mejor oxigenación. Este hecho evidencia la importancia de suprimir la actividad de c-Met durante la terapia anti-angiogénica asociada al cáncer, con el objetivo de prevenir la potencial diseminación de células cancerosas. Así pues, la inactivación de c-Met podría tener efectos anti-invasivos y anti-angiogénicos al mismo tiempo.

## 5. Los receptores de angiopoietinas

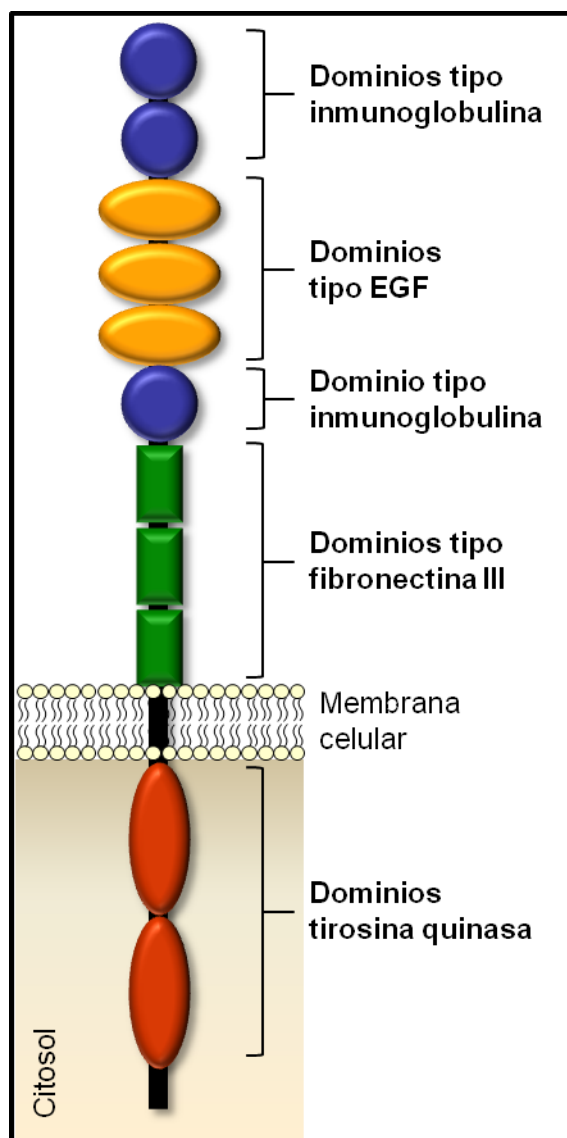
Los receptores Tie (Tie1 y Tie2) fueron el segundo sistema de señalización específico del endotelio vascular en ser caracterizado. El acrónimo Tie (*Tyr kinase with Ig and EGF homology domains*) hace referencia a propiedades estructurales del dominio extracelular del receptor y a su actividad tirosina quinasa (Partanen *et al.*, 1992). La caracterización de fenotipos letales durante el desarrollo embrionario de ratones *knockout* para los receptores Tie (Dumont *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995) estimuló el interés en la identificación de ligandos específicos y en las vías de señalización intracelular utilizadas por dichos receptores.

Las angiopoietinas (Ang1, Ang2 y Ang3) son una familia de factores de crecimiento que actúan como ligandos para el receptor Tie2 en el ratón. Ang1 actúa como ligando agonista (Davis *et al.*, 1996) e induce la fosforilación de Tie2, cuyas vías de señalización regulan la maduración y quiescencia vascular mediante estabilización de interacciones celulares, reclutamiento de células murales y transmisión de señales de supervivencia al endotelio vascular (Eklund and Olsen, 2006; Suri *et al.*, 1996; Thurston *et al.*, 1999). Por su parte, Ang2 es un antagonista funcional que se une a Tie2 sin inducir su fosforilación (Gale *et al.*, 2002; Maisonpierre *et al.*, 1997), aunque puede actuar como agonista en ciertos tipos celulares y/o contextos experimentales; así pues, Ang2 es un regulador complejo que participa tanto en la brotación como en la regresión vascular y su acción definitiva depende de la presencia de otros factores de crecimiento como VEGF-A (Gale *et al.*, 2002). Ang3 corresponde a un ortólogo de ratón de la angiopoietina humana Ang4 (Valenzuela PNAS 1999), si bien sus funciones se encuentran mucho menos caracterizadas, las evidencias sugieren que, al igual que Ang2, es un ligando antagonista con acción dependiente de contexto (Eklund and Olsen, 2006).

### 5.1 Estructura y función del receptor Tie2

Los receptores Tie son proteínas transmembranales simples con un dominio extracelular de unión a ligando y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (Figura 5). Tie2 se encuentra altamente conservado en la evolución de los vertebrados, desde el pez cebra al humano, y la mayor homología aminoacídica corresponde al dominio catalítico (Kobayashi and Lin, 2005). Ambos receptores (Tie1 y Tie2) comparten una gran similitud estructural y sus dominios intracelulares están ampliamente conservados (76% de identidad) (Macdonald *et al.*, 2006).

Todos los efectos de Ang1 sobre Tie2 son compatibles con un modo de acción que implica la activación de dicho receptor; en contraposición, las acciones de Ang2 pueden ser de carácter agonista o antagonista en función del contexto celular y del estado de activación del endotelio (Augustin *et al.*, 2009). Así pues, en la vasculatura quiescente Ang2 actúa como un inhibidor del eje Ang1-Tie2 y su efecto inmediato es el de desestabilizar el endotelio (Scharpfenecker *et al.*, 2005) mientras que en el endotelio activado actúa como un estimulador de Tie2 (Daly *et al.*, 2006). Además del contexto funcional



**Figura 5. Estructura de los receptores Tie.** La región extracelular de los receptores Tie posee dos dominios tipo inmunoglobulina (Ig), el segundo de ellos sirve como sitio de unión al ligando; tres dominios tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) y un dominio adicional tipo Ig. La región intracelular posee dos dominios con actividad tirosina quinasa.

del endotelio, la localización celular de Tie2 y la presencia de otros mediadores angiogénicos, el efecto final (agonista o antagonista) en la activación del receptor puede depender de diferencias en la estructura del ligando o su grado de oligomerización (Davis *et al.*, 2003; Fukuhara *et al.*, 2008; Saharinen *et al.*, 2008).

La caracterización funcional *in vivo* de Tie2 ha sido posible gracias al desarrollo de modelos murinos *knockout* o que expresan formas dominantes negativas de Tie2. En ambos casos los ratones mueren durante el desarrollo embrionario entre E10.5 y E12.5 debido a defectos en la integridad del endotelio vascular, causados por un dramático descenso en la cantidad de células endoteliales, deficiencia de células accesorias (pericitos y células de músculo liso) y anomalías en el desarrollo cardíaco y hematopoyético (Dumont *et al.*, 1994; Takakura *et al.*, 1998).

El resultado final de la señalización a través de Tie2 depende estrechamente de la abundancia relativa de Ang1 y Ang2, del estado basal del endotelio y de la presencia de otros mediadores celulares. La acción paracrina de Ang1, expresada de forma constitutiva a niveles bajos en el endotelio, controla la quiescencia vascular y mantiene al endotelio en un estado basal no proliferativo con propiedades anti-trombóticas y anti-adhesivas (Augustin *et al.*, 2009). Por su parte, Ang2 actúa como un antagonista natural de Ang1 y es expresado

de forma prominente en células endoteliales de sitios donde ocurre regresión vascular fisiológica (Maisonpierre *et al.*, 1997). Sin embargo, el efecto funcional neto de la inhibición de Tie2 mediada por Ang2 depende de la presencia de otras citoquinas en el microambiente local. En presencia de VEGF, Ang2 estimula la migración celular, la proliferación y la brotación de nuevos vasos sanguíneos, mientras que en ausencia de dicho factor de crecimiento la presencia de Ang2 induce la muerte de las células endoteliales y la regresión vascular (Lobov *et al.*, 2002).

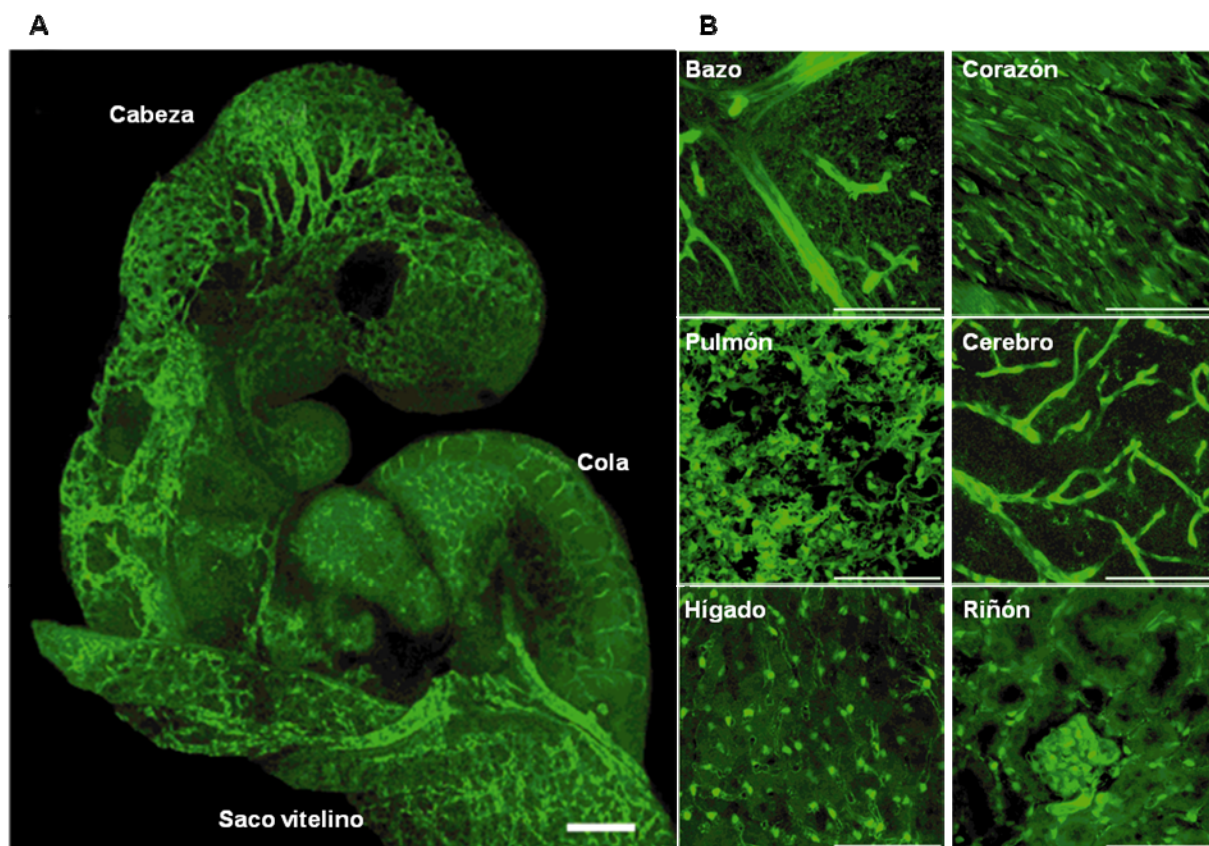
## 5.2 Patrón de expresión del gen *Tie2*

### 5.2.1 Como marcador de fenotipo endotelial

*Tie2* es considerado uno de los marcadores de fenotipo endotelial más fiable en los distintos estadios de desarrollo (Figura 6) y su expresión es una característica general de todas las células endoteliales (Sato *et al.*, 1995; Schlaeger *et al.*, 1997; Schnurch and Risau, 1993).

Durante el desarrollo del ratón la expresión de *Tie2* se detecta inicialmente en el mesodermo extraembrionario a partir del día E7.5; a E8.0 la expresión se hace más pronunciada, se extiende al alantoides y al componente mesodérmico de las islas vasculares en el saco vitelino, así como a la capa mesodérmica del amnios donde persiste hasta E12.5. En el tejido embrionario propiamente, la expresión de *Tie2* se detecta por primera vez a E8.5 en la vasculatura en desarrollo del embrión, incluyendo la aorta dorsal, el endocardio y los vasos intersegmentales (Dumont *et al.*, 1995).

En el endotelio de la vasculatura quiescente del ratón adulto, *Tie2* se expresa de forma constitutiva, a bajos niveles y suele estar constantemente activado, condición necesaria para la transmisión continua de estímulos de supervivencia a las células endoteliales y para el mantenimiento de la quiescencia (Jones *et al.*, 2001). Por su parte, en las áreas de angiogénesis activa existe



**Figura 6. Expresión de *Tie2* en el endotelio vascular.** Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control de secuencias promotoras y potenciadoras del gen *Tie2*. A. Embrión a E9.5. B. Órganos de un animal adulto. Figura adaptada de Motoike *et al.*, 2000.

sobreexpresión de *Tie2*, especialmente en los vasos de nueva formación, que se asocia al crecimiento, remodelación y maduración de dichas estructuras (Peters *et al.*, 2004).

### 5.2.2 Expresión de *Tie2* en células hematopoyéticas

Los receptores Tie también son expresados por células hematopoyéticas circulantes incluyendo megacariocitos así como por células madre hematopoiéticas en la médula ósea (Augustin *et al.*, 2009). Las células madre hematopoyéticas con expresión de *Tie2* son reconocidas como una subpoblación caracterizada por su fenotipo quiescente y anti-apoptótico; están relacionadas con el establecimiento y mantenimiento de los nichos de células madre en la médula ósea y con la capacidad de repoblación hematopoyética a largo plazo (Arai *et al.*, 2004).

Por otra parte, se ha descrito la expresión de *Tie2* en una subpoblación de monocitos que son activamente reclutados a lesiones neoplásicas, donde promueven la neovascularización tumoral (De Palma *et al.*, 2005). Éstas células son capaces de modular la angiogénesis en respuesta a señales del microambiente tumoral como la hipoxia (Lewis *et al.*, 2007) y constituyen una reserva de monocitos proangiogénicos diferenciados, capaces de contribuir a eventos fisiológicos como la regeneración hepática (De Palma *et al.*, 2003). El desarrollo de terapias capaces de bloquear la acción proangiogénica de los monocitos que expresan *Tie2* podría representar una alternativa terapéutica de difícil evasión dada la estabilidad genética y escasa proliferación de estas células (De Palma *et al.*, 2007).

### 5.2.3 Expresión de *Tie2* en la vasculatura tumoral

Las angiopoietinas y el receptor Tie2 participan en varios eventos asociados al desarrollo de la vasculatura tumoral, fundamentalmente en la angiogénesis, inflamación y extravasación vascular (Shim *et al.*, 2007). Su influencia es importante desde las primeras etapas de la vascularización tumoral y participan en la desestabilización inicial que permite la infiltración de proteasas, citoquinas y células mieloides proangiogénicas que posteriormente dirigen el desarrollo de la vasculatura tumoral (Huang *et al.*, 2010).

*Tie2* es sobreexpresado en el endotelio de la vasculatura de varios tipos de cáncer como el carcinoma hepatocelular y pulmonar, astrocitoma, sarcoma de Kaposi, angiosarcoma, cáncer colorrectal y tumores de mama, próstata, estómago, tiroides y tracto biliar; además, dicha sobreexpresión ha sido relacionada con el potencial metastático y la agresividad tumoral (Chin *et al.*, 2003; Dales *et al.*, 2003; Tait and Jones, 2004; Zhang *et al.*, 2006). La expresión de *Tie2* en la vasculatura tumoral es heterogénea y depende fundamentalmente del tipo tumoral (Fathers *et al.*, 2005); en cáncer de mama se ha demostrado que la expresión de *Tie2* se concentra en “hot spots” vasculares que coinciden con los límites del tumor que lideran la invasión del tejido circundante (Kobayashi and Lin, 2005; Peters *et al.*, 2004). Por otra parte, existen evidencias que sugieren que las células cancerosas pueden regular por sí mismas la expresión de *Tie2* en las células endoteliales vecinas; así como que otros factores asociados

al desarrollo tumoral (estrés mecánico, hipoxia, TNF- $\alpha$ ) son capaces de modular la expresión de *Tie2* (Fathers *et al.*, 2005).

## 6. Modelos murinos genéticos basados en secuencias de los receptores Tie

La expresión preferencial de los receptores Tie en las células endoteliales y su activa participación durante diversos procesos de la angiogénesis, hacen de ellos buenos candidatos para dirigir la expresión de genes específicamente al endotelio vascular. La mayoría de los modelos de ratones modificados genéticamente basados en los genes *Tie1* o *Tie2* son transgénicos que utilizan los elementos promotores y potenciadores de dichos genes para dirigir la expresión de proteínas catalizadoras de recombinación (Constien *et al.*, 2001; Kisanuki *et al.*, 2001). También se han generado algunos modelos en los que las secuencias de *Tie 1* o *Tie2* regulan la expresión de proteínas trazadoras cromogénicas (Schlaeger *et al.*, 1997) o fluorescentes (Hillen *et al.*, 2008; Iljin *et al.*, 2002; Motoike *et al.*, 2000). Dichos modelos (Tabla 1) han sido útiles herramientas en el estudio de los patrones de expresión de los receptores Tie, en la caracterización del desarrollo del endotelio vascular y el análisis de la función de dichos receptores en la angiogénesis fisiológica y patológica.

### 6.1 Modelos de recombinación tejido-específica

Todos los modelos descritos en los que secuencias de *Tie1* o *Tie2* dirigen la expresión de enzimas de recombinación al endotelio vascular se basan en el sistema Cre/*loxP*. La recombinasa Cre es una pequeña integrasa derivada del bacteriófago P1 que cataliza eventos definidos de recombinación de ADN entre sitios diana específicos denominados *loxP* (locus de entrecruzamiento [x] en P1) (Hamilton and Abremski, 1984). En función de la orientación específica de los elementos *loxP* que flanquean a una secuencia, ésta sufrirá un proceso de escisión o inversión catalizado por Cre.

La combinación del sistema Cre/*loxP* con la tecnología de *gene targeting* en células ES ha supuesto una revolución en las posibilidades de análisis genético en el ratón. Así pues, la delección condicional de secuencias genómicas, mediante la acción de la recombinasa Cre sobre regiones flanqueadas por sitios de reconocimiento *loxP*, se ha convertido en una aproximación frecuente en la evaluación de la función genética en tejidos, tipos celulares o momentos del desarrollo específicos (Nagy, 2000).

Existen varios modelos que utilizan secuencias del gen *Tie2* para dirigir la expresión de Cre al endotelio vascular (Constien *et al.*, 2001; Kisanuki *et al.*, 2001; Theis *et al.*, 2001). Todos ellos son modelos transgénicos convencionales en los que la expresión de Cre depende de un fragmento de 2.1 Kb del promotor de *Tie2* y un fragmento de tamaño variable (de 1.7 a 10.5 Kb) de la secuencia del primer intrón, en el que se encuentran elementos potenciadores de la transcripción de *Tie2*. A pesar de que todos comparten básicamente los mismos elementos reguladores de expresión, los patrones de

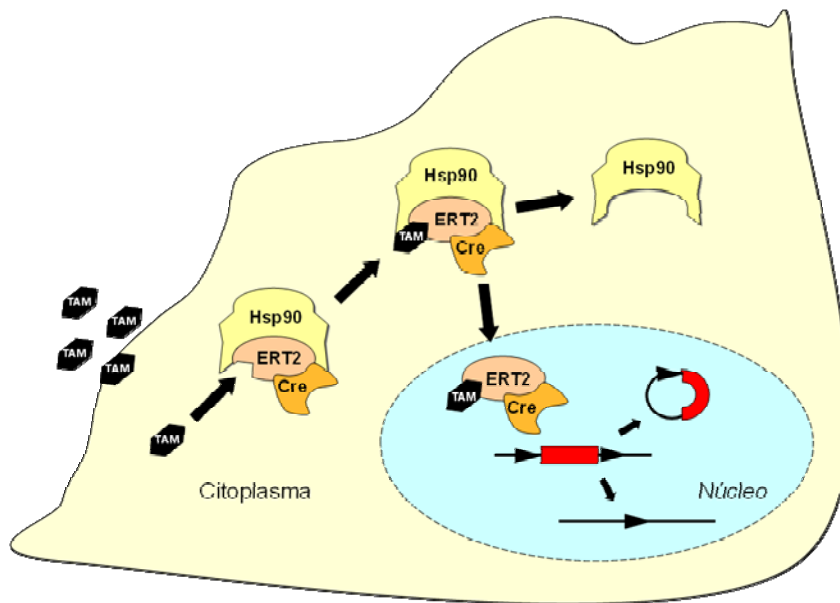


recombinación inducidos por dichos modelos varían considerablemente, quizá debido a efectos asociados al sitio de integración del transgén o al número de copias presente. Por su parte, únicamente se ha descrito un modelo que emplea la secuencia promotora de *Tie1* para dirigir la expresión de la recombinasa Cre (Gustafsson *et al.*, 2001).

	Gen	Secuencia utilizada	ADN exogeno	Tipo de modelo	Referencia
Modelos trazadores	<i>Tie2</i>	Promotor + potenciador del primer intron	LacZ	Transgenico	(Schlaeger <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Tie2</i>	Promotor + potenciador del primer intron	LacZ	Transgenico	(Teng <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Tie1</i>	Promotor	LacZ	Transgenico	(Korhonen <i>et al.</i> , 1995)
	<i>eNOS</i>	Gen completo	GFP	Transgenico	(van Haperen <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Nesfina</i>	Potenciador del segundo intrón	GFP	Transgenico (atmico desnudo)	(Amoh <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Tie2</i>	Promotor + potenciador del primer intron	GFP	Transgenico	(Motoike <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Tie2</i>	Promotor + potenciador del primer intron	GFP	Transgenico (atmico desnudo)	(Hillen <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Vegf</i>	Promotor	GFP	Transgenico	(Kishimoto <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Vegf</i>	Promotor	Luciferasa	Transgenico	(Wang <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Vegfr2</i>	Promotor	Luciferasa	Transgenico	(Zhang <i>et al.</i> , 2004)
Modelos de recombinación tejido-especifica	<i>Tie1</i>	Promotor	Cre	Transgenico	(Gustafsson <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Tie2</i>	Promotor + potenciador del primer intron	Cre	Transgenico	(Koni <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Tie2</i>	Promotor + potenciador del primer intron	Cre	Transgenico	(Constien <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Tie2</i>	Promotor + potenciador del primer intron	Cre	Transgenico	(Kisanuki <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Tie2</i>	Promotor	Cre	Transgenico	(Li <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Tie2</i>	Promotor + potenciador del primer intron	Cre	Transgenico	(Braren <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Cdh5</i>	Promotor	Cre	Transgenico	(Alva <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Cdh5</i>	Promotor	Cre	Transgenico	(Kogata <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Cdh5</i>	Promotor + secuencias aisladoras	Cre	Transgenico	(Chen <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Tie2</i>	Promotor + potenciador del primer intron	CreERT2	Transgenico	(Forde <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Tie2</i>	Gen completo (BAC)	CreERT2	Transgenico	(Korhonen <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Pdgfrb</i>	Gen completo (PAC)	CreERT2	Transgenico	(Claxton <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Cdh5</i>	Promotor	CreERT2	Transgenico	(Monvoisin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Cdh5</i>	Gen completo (PAC)	CreERT2	Transgenico	(Sorensen <i>et al.</i> , 2009)
	<i>SCL</i>	Potenciador endotelial 5'	CreERT	Transgenico	(Gothert <i>et al.</i> , 2004)

**Tabla 1. Modelos murinos para el estudio del sistema vascular sanguíneo. Modelos trazadores y de recombinación tejido-especifica basados en secuencias de los genes que codifican para los receptores Tie o para otras moléculas características del fenotipo endotelial.**

El desarrollo de recombinasas inducibles, mediante la fusión de Cre a versiones mutadas de dominios de unión a ligando de los receptores para hormonas esteroideas, ha permitido el establecimiento de modelos de recombinación condicional que responden a la administración de un ligando exógeno como el tamoxifeno (Feil *et al.*, 1997). En condiciones normales la fusión se encuentra retenida en el citoplasma celular asociada a chaperonas tipo Hsp90, la presencia del ligando sintético y su unión al receptor mutado induce la translocación de la fusión al núcleo donde la recombinasa lleva a cabo su actividad (Figura 7). Dicha estrategia permite controlar la activación de la recombinasa en el tiempo; si además, la expresión de la recombinasa inducible se restringe mediante la utilización de



**Figura 7. Mecanismo de acción de la recombinasa inducible CreERT2.** El tamoxifeno (hexágonos negros) induce la translocación de la recombinasa (Cre) unida al receptor de estrógenos mutado (ERT2) al núcleo celular donde cataliza la recombinación de secuencias (rectángulo rojo) flanqueadas por sitios *loxP* (triángulos negros).

promotores específicos, puede disponerse de modelos en los que el evento de recombinación es controlado espacial y temporalmente (Metzger and Chambon, 2001).

Hasta la fecha existen dos publicaciones que refieren la generación de modelos murinos que expresan versiones inducibles de la recombinasa Cre a partir de las secuencias reguladoras de *Tie2*. Uno de ellos (Forde *et al.*, 2002) expresa la recombinasa inducible

CreERT2 bajo el control de las secuencias promotoras y potencia-doras de *Tie2* antes descritas. Por su parte, el segundo modelo expresa CreERT2 a partir de todas las secuencias reguladoras de *Tie2* contenidas en un cromosoma artificial bacteriano (BAC) (Korhonen *et al.*, 2009).

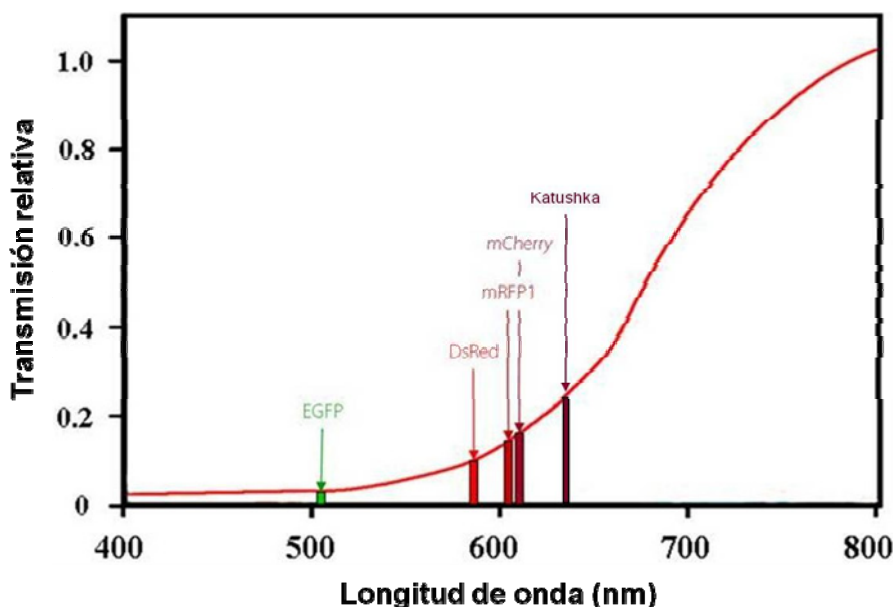
## 6.2 Modelos de expresión de proteínas trazadoras

A partir de las secuencias reguladoras de la expresión de *Tie1* o *Tie2* se han generado algunos modelos murinos que expresan proteínas trazadoras en el endotelio vascular. Hasta donde llega nuestro conocimiento, en la literatura se han reportado dos modelos que expresan la  $\beta$ -galactosidasa bacteriana bajo el control de secuencias promotoras y potenciadoras de *Tie2* (Schlaeger *et al.*, 1997; Teng *et al.*, 2002); uno de estos modelos goza de carácter inducible y la expresión de  $\beta$ -galactosidasa depende de la administración exógena de doxiciclina a través de un sistema de regulación basado en elementos inducibles por tetraciclina (Teng *et al.*, 2002). Por su parte, existe un modelo en el que un fragmento de 0.8 Kb de la secuencia promotora de *Tie1* dirige la expresión de  $\beta$ -galactosidasa en ratones transgénicos (Korhonen *et al.*, 1995).

Adicionalmente, dos modelos transgénicos en los que las secuencias reguladoras del gen *Tie2* dirigen la expresión de la proteína fluorescente verde GFP han sido reportados con anterioridad (Hillen *et al.*, 2008; Motoike *et al.*, 2000). La expresión de dicha proteína trazadora ha posibilitado la visualización de los patrones de vascularización en embriones y organismos adultos y ha facilitado la purificación de células endoteliales en virtud de su emisión de fluorescencia (Motoike *et al.*, 2000). Adicionalmente, la

expresión de GFP bajo el control de *Tie2* en ratones atímicos desnudos (Hillen *et al.*, 2008) constituye una herramienta útil para el estudio de la angiogénesis tumoral y la evaluación de terapias anti-angiogénicas en modelos de xenotransplante. Por su parte, un modelo con expresión de GFP bajo el control de secuencias promotoras de *Tie1* ha sido descrito (Iljin *et al.*, 2002), aunque su utilidad se limita al estudio del desarrollo vascular durante la embriogénesis.

Si bien dichos modelos han permitido la visualización de la vasculatura en distintos contextos biológicos, su empleo para la monitorización *in vivo* de la angiogénesis se encuentra limitado por las características espectrales de la GFP. Así pues, nuevos modelos basados en la expresión de proteínas fluorescentes optimizadas o bioluminiscentes son



**Figura 8. Transmisión relativa de la luz en los tejidos. A medida que la longitud de onda del haz de luz aumenta, mayor será la penetrancia en el tejido.**

necesarios. En tal sentido, el desarrollo de nuevas proteínas fluorescentes con características espectrales que mitigan la absorción de la señal por parte de la hemoglobina constituye una fuente adicional de trazadores. Las proteínas fluorescentes con rangos de emisión de longitud de onda superior a 600 nm (rojo lejano) gozan de una mayor transmisión relativa en los tejidos (Figura 8) y poseen un menor solapamiento con la señal autofluorescente de origen endógeno (Shcherbo *et al.*, 2010), por lo que ofrecen nuevas alternativas de visualización que incluyen la potencial detección de la señal mediante técnicas de imagen no invasivas. Dentro de este grupo de proteínas autofluorescentes con emisión superior a 600 nm se encuentran Katushka (Shcherbo *et al.*, 2007) y sus derivados, Neptuno (Lin *et al.*, 2009) y algunas variantes obtenidas por mutagénesis dirigida a partir de la proteína roja monomérica mRFP1 (Shaner *et al.*, 2004; Shaner *et al.*, 2005). El desarrollo de modelos murinos que expresen dichas proteínas de forma específica en el endotelio vascular puede favorecer el estudio, visualización y monitorización *in vivo* de los mecanismos asociados a la neovascularización fisiológica o patológica.

### 6.3 Otros modelos murinos para el estudio de la biología vascular

Además de *Tie1* y *Tie2*, otros genes cuya expresión es mayoritariamente específica para el endotelio vascular han sido utilizados para dirigir la expresión de proteínas trazadoras o inductoras de

recombinación. En tal sentido, fragmentos del promotor del gen *Cdh5*, que codifica para la cadherina vascular endotelial tipo 2, han sido empleados para expresar la recombinasa Cre (Alva *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009; Kogata *et al.*, 2006) o su forma inducible CreERT2 (Monvoisin *et al.*, 2006; Sorensen *et al.*, 2009), específicamente en el endotelio vascular. Un modelo adicional basado en *Cdh5* utiliza la secuencia genómica completa de dicho gen (clonada en un BAC) para dirigir la expresión de CreERT2 (Monvoisin *et al.*, 2006; Sorensen *et al.*, 2009). De forma similar, la secuencia completa del gen *Pdgfb* ha sido empleada en un cromosoma artificial de fago (PAC) para dirigir la expresión de CreERT2 (Claxton *et al.*, 2008). Finalmente, el potenciador endotelial 5' del locus del factor de transcripción SCL (*stem cell leukemia*) ha sido utilizado en un modelo transgénico convencional para dirigir la expresión de la recombinasa inducible CreERT (Gothert *et al.*, 2004).

Por su parte, modelos transgénicos con expresión de GFP en la vasculatura sanguínea han sido desarrollados mediante el empleo de las secuencias de los genes que codifican para la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (van Haperen *et al.*, 2003), nestina (Amoh *et al.*, 2005) o VEGF (Kishimoto *et al.*, 2000). Este último gen, así como el que codifica para el receptor 2 de VEGF han sido empleados para dirigir la expresión de la proteína bioluminiscente luciferasa en modelos transgénicos que permiten la monitorización *in vivo* de la expresión de VEGF (Wang *et al.*, 2006) o el seguimiento de la angiogénesis mediante técnicas no invasivas (Zhang *et al.*, 2004).

---

# OBJETIVOS

---



1. Generar y caracterizar una línea de ratones modificados genéticamente que permita la inducción de mutaciones condicionales específicamente en el endotelio vascular sanguíneo.
2. Utilizar dicha línea para analizar la relevancia específica de la señalización mediada por el receptor c-Met en el endotelio vascular sanguíneo en situaciones fisiológicas y patológicas.
3. Generar y caracterizar una línea de ratones modificados genéticamente optimizada para la monitorización de eventos de recombinación mediados por la recombinasa Cre mediante técnicas de imagen molecular.





---

# MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1. Generación del modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup>

### 1.1 Construcción del vector de *targeting* Tie2-IRES-CreERT2

Los brazos de homología del vector de *targeting* Tie2-IRES-CreERT2 se aislaron y clonaron de secuencias correspondientes a los exones 21, 22 y 23 (e intrones asociados) del gen *Tie2* a partir de ADN genómico de células madre embrionarias (células ES) de ratón, de fondo genético puro 129Sv/Pas. Mediante PCR se amplificaron las secuencias Tie2-BH5di (6.5 Kb), que da lugar a la porción distal del brazo de homología 5' (oligonucleótidos directo: BH5-E1, 5' ACC AAT AAA AGC CCC ATC CTA AAG G 3'; y reverso: BH5-F1, 5' TTC ACC TAT GCC ACA TTT GGT ATG G 3'), y Tie2-BH3 (3.2 Kb), que da lugar al brazo de homología 3' (oligonucleótidos directo: BH3-A2, 5' AGA GAT AAG GAA GCC AGG ACA TTT ACC 3'; y reverso: BH3-B2, 5' TCT TAG AAA TGT TTG GTG GCT CTG G 3'). Dichas secuencias se clonaron en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen) y se secuenciaron para identificar posibles mutaciones introducidas durante la amplificación. Con el objeto de disminuir la probabilidad de mutaciones durante la amplificación por PCR, el número de ciclos se limitó a 15. Por su parte, la secuencia Tie2-BH5pr (5.2 Kb), de la que se obtiene la parte proximal del brazo de homología 5', se obtuvo por digestión *SacI* (Roche) del BAC #bMQ-55D4 (colección 129S7/AB2.2 del Sanger Institute); los fragmentos obtenidos se clonaron mediante el sistema *Zero<sup>TM</sup> Background Cloning Kit* (Invitrogen), y se seleccionaron colonias por hibridación utilizando una sonda de 437 pb que reconoce una secuencia específica dentro del exón 23. La sonda se generó por PCR utilizando los oligonucleótidos: directo, e23-G2 (5' AAA TCA CTG TCA CAC ACA TAC AGA GG 3') y reverso, e23-H2 (5' ATC TTA GCA CAT TCT TAC TCC GAG C 3').

Posteriormente, se procedió a la síntesis de secuencias adaptadoras (A-BH3, A-Neo y A-BH5) que incluyen las dianas de restricción necesarias para que la generación del vector de *targeting* se realice mediante pasos sucesivos de clonación por extremos cohesivos. La secuencia adaptadora A-BH3 incluye una región que corresponde al extremo proximal del brazo de homología 3', mientras que la secuencia adaptadora A-Neo contiene dos fragmentos que corresponden al extremo proximal del brazo de homología 5' y a la secuencia codificante del exón 23 hasta el codón de terminación de traducción (TAG).

En la construcción de los vectores de *targeting* se emplearon técnicas básicas de biología molecular para la digestión, resolución, purificación y clonación de secuencias de ADN. Por una parte los fragmentos *PmeI/SacI* y *SacI/PmlI* obtenidos de las secuencias Tie2-BH5di y Tie2-BH5pr, respectivamente, se clonaron en dos pasos sucesivos en la secuencia adaptadora A-BH5 dando lugar al vector Tie2-A-BH5 que contiene el brazo de homología 5' completo. Al mismo tiempo, se clonó el fragmento *BalI/SbfI* obtenido de la secuencia Tie2-BH3 en el plásmido adaptador A-BH3 dando lugar al vector Tie2-A-BH3 que contiene el brazo de homología 3' completo; en dicho vector se introdujo la fusión IRES-CreERT2 obtenida por digestión *NotI/EcoRI* del plásmido pCV11 (construido por Victoria Campuzano en el laboratorio del Dr. Mariano Barbacid) dando lugar al vector Tie2-BH3-CreERT2. De

forma paralela se generó el vector Tie2-Neo mediante clonación del casete de resistencia a neomicina (PGK-neo) flanqueado por sitios *frt* (contenido en el plásmido pDELBOY construido en el laboratorio del Dr. Tom Makela) en los sitios *XhoI/Bst*11071 del plásmido adaptador A-Neo.

A continuación, el fragmento *PmlI/NotI* del plásmido Tie2-Neo (que contiene el casete de resistencia a neomicina y la secuencia del exón 23 hasta su codón de terminación) y el fragmento *NotI/HincII* del vector Tie2-BH3-CreERT2 (que contienen la proteína de fusión y el brazo de homología 3') se clonaron en el vector Tie2-A-BH5 (que contiene el brazo de homología 5') dando lugar al vector Tie2-BH-CreERT2. Finalmente, a dicho vector se clonó en los sitios *Sall/PmeI* la secuencia de la toxina diftérica  $\alpha$  (DTA) obtenida por digestión *Sall/EcoRV* del plásmido G112 (GenOway). De esta manera se obtiene el vector de *targeting* Tie2-IRES-CreERT2 (una representación esquemática del proceso se muestra en la Figura 13 de Resultados).

### 1.2 Electroporación en células ES

Células madre embrionarias (células ES) V6.4 de fondo genético mixto 129S4/SvJae x C57BL/6J fueron cultivadas sobre una monocapa de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) previamente tratados con mitomicina y resistentes a neomicina, en DMEM/Glutamax-I (Gibco), 2-mercaptoetanol 0.1 mM (Gibco), aminoácidos no esenciales 1X (Gibco), piruvato sódico 1 mM (Gibco), penicilina-estreptomicina 50 U/mL-50 µg/mL (Gibco), LIF 1000 U/mL (Chemicon) y suero fetal bovino 15% (Gibco).  $5 \times 10^6$  células ES en 800 µL de PBS fueron electroporadas con 20 µg del vector de *targeting* en un electroporador BioRad *Gene Pulser II* (240 V y 500 µF).

Tras la electroporación las células se sembraron en una placa de 10 cm sobre una monocapa de MEFs. 24 h después se inició la selección positiva mediante adición de geneticina (Gibco) a una concentración final de 200 µg/mL y se mantuvo durante una semana. De las colonias supervivientes 288 fueron seleccionadas, transferidas individualmente a placas de 96 pocillos, expandidas y triplicadas; dos de las réplicas se conservaron en congelación y la restante se expandió a placas de 24 pocillos recubiertos con gelatina para obtener ADN genómico.

### 1.3 Análisis de clones recombinantes positivos: *Southern Blot*

La evaluación de la frecuencia de recombinación homóloga y selección de clones recombinantes se realizó mediante análisis por *Southern Blot*. Para ello se extrajo ADN de las células ES creciendo en placas de 24 pocillos mediante digestión del sedimento celular con proteinasa K (Roche) a una concentración de 500 µg/mL en tampón de lisis (NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8.0 20 mM, EDTA 10 mM y SDS 0.5%) durante 12 h a 55° C. Después de tratar las muestras con una solución saturada (>6 M) de cloruro sódico, el ADN se precipitó con isopropanol y se resuspendió en tampón TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0). Una vez extraído, el ADN genómico se digirió con 75 unidades de la enzima de

restricción *Apa*LI (New England Biolabs) durante 12 h a 37 °C en el tampón comercial de la enzima suplementado con albúmina bovina sérica (concentración final 100 µg/mL), espermidina (1 mM) y RNasa A (50 µg/mL). El producto de digestión se cargó en un gel de agarosa al 0.8% y se sometió a electroforesis. Posteriormente, el gel fue tratado según el protocolo descrito (Sambrook and Russell, 2001) y se transfirió el ADN a una membrana (Hybond<sup>TM</sup>- N+, Amersham, GE Healthcare) mediante migración por capilaridad en una solución SSC 10X. Las membranas se sometieron a un tratamiento de entrecruzamiento por radiación ultravioleta (UV Stratalinker 1800, Stratagene), se bloquearon con solución de prehibridación (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM, NaCl 0.9 M, EDTA pH 8.0 2.5 mM, polivinilpirrolidona 2 mM, Ficoll-400 0.8 mg/mL, SDS 10 mg/mL, sulfato de dextrano 50 mg/mL, formamida 50% y ADN de esperma de salmón 0.05 mg/mL) durante al menos 2 h a 42 °C y se incubaron a esa misma temperatura con la sonda marcada durante una noche. El marcaje de la sonda se realizó con α-<sup>32</sup>P-dCTP utilizando el sistema de marcaje radioactivo comercial *Rediprime<sup>TM</sup> II* (GE Healthcare).

Las sondas utilizadas para el análisis por *Southern Blot* se amplificaron por PCR y se clonaron en el plásmido pGEM-T mediante el sistema pGEM-T *Easy Vector System I* (Promega). Para analizar la recombinación homóloga del brazo 5' se utilizó la sonda B1 (309 pb) generada utilizando los siguiente oligonucleótidos: directo, Tie2\_5'B1\_F (5' AGT GAG GTT GTG GAG GGA GG 3') y reverso, Tie2\_5'B1\_R (5' TGC GGG TGT CCT ACT ATA CG 3'). Por su parte, para analizar la recombinación homóloga del brazo 3' se utilizó la sonda III (272 pb) generada utilizando los siguientes oligonucleótidos: directo, sonda III Tie2\_F (5' CAT GAT CTG TAT ACT TC 3') y reverso, sonda III Tie2\_R (5' TCC CAG GAC CAC AAA GC 3'). Ambas sondas son complementarias a secuencias localizadas fuera del área reconocida por los brazos de homología de los vectores de *targeting*.

## 1.4 Introducción de células ES recombinantes a embriones en desarrollo

Los clones de células ES con un alelo recombinante homólogo se incorporan a embriones en desarrollo mediante microinyección de células ES en blastocistos de ratón. Para ello se obtuvieron mórulas a día E2.5 (tomando como día E0.5 la presencia de tapón vaginal) mediante perfusión con medio M2 (Sigma) del oviducto y el útero de hembras C57BL/6J sometidas a un tratamiento de superovulación y cruzadas con machos fértiles. Las mórulas obtenidas se incubaron durante una noche en medio KSOM (Specialty Media) a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> para promover su desarrollo al estado de blastocisto. Posteriormente, de una suspensión de células ES procedentes de un clon en el que hubo recombinación homóloga, se tomaron 5 a 7 células de morfología óptima y se inyectaron en el blastocelo de los embriones con ayuda de un microscopio DM-IRB (Leica) y micromanipuladores mecánicos (Leica). A continuación, los blastocistos inyectados se transfirieron a hembras pseudo-gestantes que llevan la gestación a término y dan a luz camadas en las que se evalúa la presencia de quimeras por análisis de la pigmentación.

Todos los ratones utilizados en este estudio se mantuvieron en el animalario del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, temperatura media de 20-

24°C y humedad relativa del 45±15% según las directrices establecidas por el Real Decreto 1201/2005 que regula el uso de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Todos los ensayos realizados se diseñaron y ejecutaron en función del cumplimiento de los requisitos éticos y sanitarios establecidos y fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética y Bienestar Animal (CBBA) del Instituto de Salud Carlos III.

### 1.5 Genotipado y cruzamientos

Las quimeras macho de alta contribución, a juzgar por el porcentaje de pigmentación agouti, se cruzaron con hembras C57BL/6J. Las crías fueron genotipadas mediante PCR usando para ello los siguientes oligonucleótidos: directo, TekTr19\_F1 (5' GAC TGC TCT GCG GAA GAA GC 3') y reversos, TekTr19\_R1 (5' CTG TGC TGT CAA GGG AAT GC 3') y NeoTr19\_R1 (5' GAT ACC GTC GAG GAA GTT CC 3'). Los 3 en conjunto permiten identificar tanto el alelo silvestre (454 pb) como el recombinante (228 pb) en una misma reacción de amplificación.

Los ratones portadores del alelo recombinante *Tie2*<sup>Neo-CreERT2</sup> se cruzaron con ratones de la línea transgénica Tg.CAG-Flp para eliminar el marcador de selección positiva PGK-Neo. Las crías fueron genotipadas mediante PCR para identificar aquellas que han heredado una copia funcional del alelo recombinante (*Tie2*<sup>CreERT2</sup>). La identificación de los alelos silvestres y *knockin* se realiza en la misma reacción de amplificación sustituyendo el oligonucleótido reverso NeoTr19\_R1 por uno designado IRESTR19-R1 (5' GAA GAC AGG GCC AGG TTT CC 3') el cual permite amplificar una banda de 260 pb siempre que el alelo recombinante haya perdido el marcador de selección positiva. Adicionalmente se genotipan los animales para el alelo Tg.CAG-Flp con los oligonucleótidos: directo, FlpeS (5' CTA ATG TTG TGG GAA ATT GGA GC 3'); y reverso, FlpeAS (5' CTC GAG GAT AAC TTG TTT ATT GC 3').

Finalmente, los ratones *Tie2*<sup>CreERT2</sup> se cruzaron con animales de la línea trazadora de Cre *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>. El genotipado de dicho alelo se realizó mediante PCR con los siguientes oligonucleótidos: Rosa1 (5' AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT 3'), IMR315 (5' GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC 3') e IMR316 (5' GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG 3'). Éstos permiten la identificación del alelo silvestre (~500 pb) y el modificado (~250 bp) en la misma reacción de amplificación.

### 1.6 Análisis de expresión protéica mediante *Western Blot*

Para el análisis por *Western Blot* se prepararon extractos protéicos de embriones a E13.5 en tampón de lisis RIPA: Tris HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, deoxicolato sódico 1%, EDTA 5 mM, PMSF 2 mM, SDS 0.1% y cocktail inhibidor de proteasas (Complete Mini, Roche). Tras trituración mecánica del tejido, el homogenato se incubó en hielo 45 min y se centrifugó 30 min a 14,000 g y 4 °C. La concentración de proteína total se cuantificó mediante espectrofotometría tras adición de reactivo de Bradford empleando un kit comercial (Protein Assay, BioRad).

La resolución electroforética de 100 µg de proteína se realizó en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 7.5% en condiciones reductoras y desnaturalizantes, a continuación se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Protran) en un equipo de transferencia en húmedo (BioRad) durante 2 h a 200 mA. Tras la transferencia la membrana se bloqueó en una solución de leche desnatada al 5% en TBST (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM y Tween-20 0.1%) durante 2 h a temperatura ambiente y se hibridó con anticuerpo anti-Tie2 (C-20, Santa Cruz Co.) a una dilución 1:200 en solución de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 h. Luego la membrana se lavó tres veces en solución TBST a temperatura ambiente, con agitación y se hibridó con el anticuerpo secundario correspondiente (*Polyclonal Goat anti-rabbit Ig*, Dako) a una dilución 1:1000 en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar la membrana en TBST se revela mediante un kit comercial de quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

## 2. Caracterización del modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup>

### 2.1 Preparación y administración de tamoxifeno

#### 2.1.1 Dieta suplementada con tamoxifeno

Para la inducción de recombinación mediante tratamiento en la dieta, los ratones fueron alimentados *ad libitum* con un pienso comercial suplementado con tamoxifeno (0.4 mg de tamoxifeno/g de pienso, Harlan Teklad) durante un período de tiempo variable. Antes de la administración de la dieta suplementada con tamoxifeno los ratones fueron alimentados durante diez días con una dieta de adaptación para favorecer el cambio de la dieta habitual a la suplementada.

#### 2.1.2 Preparación de tamoxifeno para inyección intraperitoneal en animales adultos

Para la administración de tamoxifeno por vía intraperitoneal (IP) a ratones adultos se preparó una solución de tamoxifeno (Sigma) a razón de 20 mg por mL en etanol (Merck)-aceite de maíz (Sigma) 1:10. La suspensión inicial es totalmente disuelta mediante tres rondas de sonicación de un min de duración a una amplitud del 30% con intervalos de dos min entre ellas manteniendo todo el tiempo la muestra en hielo. El volumen máximo administrado por vía IP fue de 250 µl (5 mg).

#### 2.1.3 Preparación de tamoxifeno para inyección intragástrica en neonatos

Para la administración de tamoxifeno por vía intragástrica a ratones neonatos se preparó una solución de tamoxifeno a razón de 10 mg por mL de etanol-aceite de maíz 1:4. Para ello 10 mg de tamoxifeno se disolvieron en 250 µl de etanol mediante agitación. Una vez disuelto, se añadieron 750 µl de aceite de maíz y se agitó hasta obtener una emulsión. A partir de dicha emulsión cada día de

tratamiento se preparó una alícuota de tamoxifeno a 1 ó 2 mg/mL mediante dilución 1:10 ó 1:5 en aceite de maíz. El volumen administrado a cada cría fue de 50  $\mu$ l (50 ó 100  $\mu$ g) por vía intragástrica.

## 2.2 Análisis de expresión de $\beta$ -galactosidasa

### 2.2.1 Tinción X-gal de muestras en preparación completa (*whole mount*)

El análisis de expresión de  $\beta$ -galactosidasa mediante tinción con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido, Vennova) en preparaciones completas de tejido, se realizó sobre muestras tisulares de animales adultos (fundamentalmente diafragma y peritoneo) y embriones completos a distintos días de desarrollo (E10.5-E14.5). Las muestras se fijaron durante un período de tiempo variable (25 min para los tejidos adultos y 10-30 min para embriones) en solución de fijación (glutaraldehído 0.2%, paraformaldehído (PFA) 1.5%,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, EGTA 5 mM, tampón fosfato pH 7.2 0.1 M) y se permeabilizaron (2 x 30 min) con solución de lavado (Nonidet P-40 0.2%, deoxicolato sódico 0.1%,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, tampón fosfato pH 7.2 0.1 M). A continuación las muestras se introdujeron en la solución de tinción (solución de lavado suplementada con ferrocianuro potásico 5 mM, ferrocianato potásico 5mM y X-gal 1 mg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 12-24 h protegidos de la luz. Una vez teñidas, las muestras se lavaron con la solución de lavado (2 x 20 min) a temperatura ambiente y se fijaron en formalina (12 h a temperatura ambiente). Tras lavar en PBS las muestras se transfirieron a una solución de etanol al 50% durante 2 h y finalmente a una solución de etanol al 70% en las que fueron conservadas hasta la adquisición de imágenes y/o su inclusión en bloques de parafina. Las imágenes de las tinciones X-gal en preparación completa fueron adquiridas en un estereoscopio MZ10F (Leica) equipado con una cámara fotográfica DFC490 (Leica) y mediante el *software* AS Suite (Leica).

La inclusión de las muestras en bloques de parafina se realizó tras deshidratación del tejido mediante tratamiento con soluciones crecientes de etanol y 2-propanol en un procesador automático (2 x 60 min etanol 95%, 2 x 60 min etanol 100%, 2 x 60 min 2-propanol 100%, 2 x 60 min 2-propanol/parafina precalentada a 60 °C y 2 x 60 min parafina). Una vez constituidos los bloques, se obtuvieron secciones de 4  $\mu$ m de grosor que se contratiñeron con un marcador del núcleo celular NFR (*Nuclear Fast Red*) en un teñidor Shandon Varistain Gemini (Thermo) y se montaron en ClearVue Mountant XYL (Thermo Scientific). La adquisición de imágenes se realizó con el *software* Pannoramic Viewer (3DHISTECH, versión 1.15.1) previa digitalización de las preparaciones histológicas en un escáner Mirax Scan (Carl Zeiss) mediante el *software* Pannoramic Scanner 150 (3DHISTECH, versión 1.15).

### 2.2.2 Tinción X-gal de crio secciones

Para la tinción X-gal de crio secciones, muestras de órganos recién extraídos se incluyeron en criomoldes plásticos (Tissue-Tek) y se les cubrió con el agente crioprotector OCT (Tissue-Tek). Inmediatamente se transfirieron a nieve carbónica y una vez solidificados se conservaron a -80 °C. En un



criostato CM1900 (Leica) se obtuvieron secciones de 10  $\mu\text{m}$  de grosor que se adhieren a portaobjetos de vidrio (Superfrost, Thermo Scientific). Tras dejar secar a temperatura ambiente durante 1 h, las muestras se fijaron en glutaraldehído 0.2%,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, EGTA 5 mM, tampón fosfato pH 7.2 0.1 M; y se permeabilizaron mediante dos tratamientos de 30 min con solución de lavado (Nonidet P-40 0.02%, deoxicolato sódico 0.01%,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, tampón fosfato pH 7.2 0.1 M). A continuación las muestras se introdujeron en la solución de tinción precalentada (solución de lavado suplementada con ferrocianuro potásico 5 mM, ferrocianato potásico 5mM y X-gal 1 mg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 12-24 h protegidos de la luz. Una vez teñidas, las muestras se lavaron con la solución de lavado (3 x 15 min a temperatura ambiente) y con PBS (4 x 10 min a temperatura ambiente) antes de ser contrateñidas con NFR y montadas para su observación. La adquisición de imágenes se realizó de la manera descrita en el apartado 2.2.1 de Materiales y Métodos.

### 2.2.3 Inmunohistoquímica

El análisis por inmunohistoquímica se realizó a partir de muestras de tejidos fijadas en formalina durante 12 a 24 h. A continuación, las muestras fueron deshidratadas siguiendo un tratamiento convencional con soluciones crecientes de etanol y xilol en un procesador automático (2 x 60 min etanol 95%, 2 x 60 min etanol 100%, 2 x 60 min xilol 100%, 2 x 60 min xilol/parafina precalentada a 60 °C y 2 x 60 min parafina). Una vez constituidos los bloques se obtuvieron secciones de 2.5  $\mu\text{m}$  de grosor que se desparafinaron por incubación a 55 °C durante 1 h. A continuación se realizó recuperación antigénica inducida por calor con tampón citrato a pH 6.1 (Dako) y se introdujeron los cristales en un equipo de inmunohistoquímica automatizada (AutostainerPlus, Dako o Discovery XT, Ventana). Relación de anticuerpos utilizados: anti- $\beta$ -galactosidasa (monoclonal de rata, producido por la Unidad de Anticuerpos Monoclonales del CNIO, dilución 1:125 del sobrenadante), anti-CD31 (policlonal de conejo, abcam 28364, dilución 1:100), anti-Lyve1 (policlonal de conejo, abcam 14917, dilución 1:100). Como anticuerpos secundarios se utilizaron: conejo anti-rata biotinilado (Dako, cat. EO468) y cabra anti-conejo-HRP (Dako, cat. PO448). El revelado se realizó con un sistema DAB (Dako) y la contratinción de núcleos con hematoxilina. La adquisición de imágenes se realizó de la manera descrita en el apartado 2.2.1 de Materiales y Métodos.

### 2.2.4 Cuantificación de la eficiencia de recombinación

Para la cuantificación de la eficiencia de recombinación se realizó inmunohistoquímica para CD31 y  $\beta$ -galactosidasa en secciones seriadas de órganos de animales tratados con dieta tamoxifeno durante ocho semanas. A continuación, las preparaciones histológicas fueron digitalizadas; a partir de las imágenes de la sección tisular completa se realizó la cuantificación del área positiva para CD31 o  $\beta$ -galactosidasa y el área total del tejido mediante el *software* AxioVision (3DHISTECH, versión 4.8.2), y se calculó el porcentaje que representa el área positiva para cada marcador respecto al área total. La eficiencia de recombinación se expresó como la relación porcentual que representa el área positiva para  $\beta$ -galactosidasa respecto al área positiva para CD31 en cada sección analizada.

Por otra parte, a partir de criosecciones teñidas para X-gal procedentes de órganos de animales tratados con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas, se calculó el porcentaje que representa el área positiva para  $\beta$ -galactosidasa respecto al área total del tejido. A continuación, se estableció una relación aritmética entre el porcentaje de recombinación calculado previamente (mediante la comparación el área relativa  $\beta$ -galactosidasa<sup>+</sup> respecto a la CD31<sup>+</sup>) y el área porcentual que representa la tinción de X-gal en las criosecciones. De esta manera, a partir de la cuantificación del área  $\beta$ -galactosidasa<sup>+</sup> en criosecciones de animales tratados con los diferentes protocolos de inducción, y usando como referencia la relación aritmética establecida, se cuantificó la eficiencia de cada tratamiento. La eficiencia global se calculó promediando el porcentaje de recombinación detectado en secciones completas del corazón, hígado, páncreas, riñón y bazo, de al menos tres animales en cada tratamiento analizado sin que se detectaran diferencias sustanciales en el porcentaje de recombinación en los distintos órganos.

## 2.3 Análisis de poblaciones hematopoyéticas mediante citometría de flujo

### 2.3.1 Preparación de suspensiones celulares

#### 2.3.1.1 Suspensiones celulares de la médula ósea

Las suspensiones celulares de médula ósea de ratón se obtuvieron a partir de los fémures y tibias desprovistos de tejido muscular, fascias y tendones. Desde su extracción los huesos fueron conservados a 4 °C en medio de cultivo DMEM (Gibco) suplementado con HEPES (Invitrogen) y todos los pasos posteriores se realizaron en hielo. La extracción de la médula ósea se realizó mediante lavado del canal medular con 5 mL de medio utilizando una jeringuilla y agujas 25-gauge previa remoción de las epífisis óseas. Los detritus de mayor tamaño se eliminaron por sedimentación, luego el sobrenadante se transfirió a un tubo de 15 ml (Falcon) y se centrifugó a 300 g y 4 °C durante 10 min. Tras eliminar el sobrenadante las células se resuspendieron en 1 mL del tampón de lisis de eritrocitos (NH<sub>4</sub>Cl 0.15 M, KHCO<sub>3</sub> 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.2) y se incubaron durante 5 min a 37 °C. A continuación se añadieron 7 mL de medio para inactivar el cloruro de amonio y se centrifugaron las muestras bajo las mismas condiciones descritas. Tras aspirar el sobrenadante las células se resuspendieron en 8 mL de PBS suplementado con EDTA 2 mM y albúmina bovina sérica al 0.5% (tampón de análisis) y se centrifugaron nuevamente. Finalmente se resuspendieron en 200-500  $\mu$ L de tampón de análisis y dicha suspensión se filtró en una malla de nylon de 70  $\mu$ m.

#### 2.3.1.2 Suspensiones celulares de sangre periférica

La preparación de suspensiones celulares de sangre periférica se realizó a partir de muestras obtenidas mediante punción intracardiaca de animales previamente sacrificados. La sangre se colectó en tubos con EDTA para evitar su coagulación y se conservó en hielo; todos los pasos siguientes se

realizaron a 4 °C. Se transfirieron 200 µL de la sangre colectada a tubos de 1.5 mL, se añadió 1 mL de tampón de lisis de eritrocitos y se incubó a 37 °C durante 10 mins. A continuación las muestras se centrifugaron a 300 g y 4 °C durante 10 mins. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de tampón de análisis, tras centrifugar y aspirar nuevamente el sobrenadante, las células se resuspendieron en un volumen final de 200 µL de tampón de análisis y la suspensión celular se pasó filtró en una malla de nylon de 70 µm.

### **2.3.1.3 Suspensiones celulares del bazo**

La preparación de suspensiones celulares de bazo se realizó mediante disgregación de dicho órgano en medio DMEM a 4 °C, usando para ello los extremos de dos portaobjetos. La suspensión de células se colectó con una jeringuilla y agujas 21-gauge, se transfirió a tubos de 15 mL y se centrifugó a 300 g y 4 °C durante 10 min. A continuación se aspiró el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 mL de tampón de lisis de eritrocitos y se incubó durante 10 min a 37 °C. Para inactivar la lisis se añadieron 7 mL de medio, se centrifugó en las condiciones descritas y se aspiró el sobrenadante. Las células fueron lavadas una vez con 8 mL de tampón de análisis y se resuspendieron en un volumen final de 500 µL de dicho tampón antes de ser filtradas en una malla de nylon de 70 µm.

### **2.3.2 Inmunodetección de marcadores de superficie**

La inmunodetección de marcadores de superficie se realizó sobre suspensiones celulares previamente incubadas durante 20 min a 4 °C con 100 µL de una dilución 1:200 del anticuerpo rata anti-ratón CD16/CD32 (BD Pharmingen, clon 2.4G2). Dicho anticuerpo reconoce los receptores FcγII y FcγIII de los linfocitos murinos, y al unirse a ellos impide su unión inespecífica a los anticuerpos de detección. Tras el bloqueo de los receptores Fcγ, las suspensiones celulares fueron centrifugadas (10 min a 4°C y 300 g) y resuspendidas en 100 µL de una dilución 1:200 de los siguientes anticuerpos monoclonales de rata (todos de BD Pharmingen): anti-CD45 conjugado a alofococianina (APC), anti-CD11b conjugado con el tándem peridín clorofil proteína-cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5) y anti-Tie2 conjugado a ficoeritrina (PE). Tras incubar durante 30 min a 4 °C, las células fueron centrifugadas (10 min a 4°C y 300 g), se aspiró el sobrenadante y fueron resuspendidas en 200 µL de tampón de análisis con DAPI (concentración final 0.2-0.5 µg/mL) para su posterior análisis.

### **2.3.3 Adquisición y análisis de datos**

La adquisición de datos fue realizada en un BD LSRFortessa *Cell Analyzer* (BD Biosciences) equipado con lasers de longitud de onda de 355, 488, 561 y 640 nm. Para excluir agregados celulares se recurrió a análisis de características de superficie y a tinción con DAPI para discriminar las células muertas. Se colectaron al menos 50,000 eventos únicos de células vivas. Los datos fueron analizados con el *software* FlowJo (Treestar, version 9.0.2).

## 2.4 Visualización y análisis del desarrollo vascular de la retina

### 2.4.1 Disección de la retina del ratón

El procedimiento de disección utilizado ha sido descrito en detalle previamente (Pitulescu *et al.*, 2010). Los animales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub> (adultos) o por decapitación (crías), a continuación se extrajeron los globos oculares y se fijaron con la solución apropiada para cada procedimiento. Tras la fijación los globos oculares fueron lavados con PBS al menos cinco veces y fueron conservados en PBS a 4 °C hasta su disección. La disección se realizó con ayuda de un estereoscopio MZ6 (Leica) y consistió en la remoción de la córnea, el iris, la esclerótica y la capa epitelial pigmentada externa. A continuación se extirpó el cristalino junto con el humor vítreo y se eliminaron los vasos hialoides. Finalmente se realizaron cuatro incisiones profundas y equidistantes en la retina de forma tal que ésta pueda ser fácilmente aplanada para su montaje y observación. Las retinas se conservaron en PBS a 4 °C hasta su utilización ulterior.

### 2.4.2 Tinción X-gal de la retina del ratón

Para la tinción X-gal, los globos oculares fueron fijados durante 45 min a temperatura ambiente con la solución descrita en el apartado 2.2.1 de Materiales y Métodos. Tras su disección, las retinas fueron lavadas (3 x 5 min) en tampón de lavado (Nonidet P-40 0.02% y MgCl<sub>2</sub> 2 mM en PBS). A continuación se transfirieron a 2 mL de solución de tinción (solución de lavado suplementada con ferrocianuro potásico 5 mM, ferrocianato potásico 5 mM y X-gal 1 mg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 12-24 h. Una vez teñidas, las retinas fueron lavadas 5 veces con PBS y se sometieron a un tratamiento adicional de fijación con PFA al 4% durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, las retinas fueron lavadas 5 veces con PBS y se montaron en portaobjetos con medio acuoso Aquatex (Merck). La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio AX70 (Olympus), acoplado a una cámara fotográfica DP70 (Olympus) y con el *software* DP Controller (versión 2.2.1.227, Olympus).

## 3. Inactivación inducible de c-Met en el endotelio vascular sanguíneo

### 3.1 Ensayo de cicatrización de heridas

Para cada uno de estos ensayos se emplearon 10 hembras de 15 semanas de edad. 5 de ellas homocigotas para los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup>, *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> y *c-Met*<sup>fl</sup>, y las restantes 5 homocigotas para los primeros dos alelos y heterocigotas para *c-Met*<sup>fl</sup>. Los animales fueron tratados con tamoxifeno en la dieta durante 8 semanas a partir del destete e individualizados una semana antes de iniciar los procedimientos. Para la generación de las heridas los animales fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano (5% para la inducción y 2% para mantenimiento), a continuación se afeitó la zona dorsal y

se desinfectó con etanol al 70%. Las heridas se realizaron con un punzón de biopsia circular de 4 u 8 mm de diámetro (Stiefel *Laboratories*) de forma tal que se eliminó totalmente la piel y el panículo carnoso. Diariamente se midió el diámetro de la herida en orientación vertical (V) y horizontal (H) con un calibre milimetrado (Caliper) y se calculó el área de la herida ( $\pi \times r^2$ , donde  $r = (V + H)/4$ ) así como el porcentaje de cicatrización (expresado como el diferencia porcentual entre el área de la herida original y el área de la herida en cada día analizado). En días específicos del proceso de cicatrización se obtuvieron muestras de piel incluyendo áreas de piel sana y se fijaron en formalina al 10% para su inclusión en bloques de parafina y análisis por inmunohistoquímica según los protocolos descritos. En todos los casos al menos una sección se tiñó con hematoxilina-eosina (HE) o tricrómico de Masson para el análisis de la morfología histológica.

El análisis del grado de neovascularización se realizó a partir de inmunohistoquímicas para CD31 en secciones de piel previamente digitalizadas según se describió en el apartado 2.2.1 de Materiales y Métodos. La cuantificación del área positiva para CD31 y el área total que representa el tejido de granulación se realizó mediante el *software* AxioVision (3DHISTECH, versión 4.8.2). En todos los casos se calculó el porcentaje que representa el área vascular (positiva para CD31) respecto al área total del tejido de granulación. Se cuantificaron secciones de 5 animales de cada genotipo. El análisis estadístico se realizó mediante comparación de medias por métodos paramétricos (prueba *t* de student con intervalo de confianza del 95%) utilizando el *software* StatGraphics Plus 5.1 (Stat Point Inc.).

La cuantificación del infiltrado inflamatorio se realizó con el *software* AxioVision (3DHISTECH, versión 4.8.2) a partir de imágenes digitalizadas correspondientes a la inmunodetección de MPO y F4/80 en secciones del tejido cicatrizal de la piel. En todos los casos se calculó la relación porcentual que representa el área cubierta por células positivas para MPO o F4/80 respecto al área total del tejido de granulación. El análisis estadístico se realizó mediante comparación de medias por métodos paramétricos (prueba *t* de student con intervalo de confianza del 95%) utilizando el *software* StatGraphics Plus 5.1 (Stat Point Inc.).

La cuantificación de la distancia entre los bordes de reepitelización y entre los extremos de los panículos carnosos se realizó con el *software* Pannoramic Viewer (3DHISTECH, versión 1.15.1) sobre imágenes digitalizadas correspondientes a tinciones con HE o tricrómico de Masson en secciones del tejido cicatrizal de la piel. El análisis estadístico se realizó mediante comparación de medias por métodos paramétricos (prueba *t* de student con intervalo de confianza del 95%) utilizando el *software* StatGraphics Plus 5.1 (Stat Point Inc.).

### 3.2 Ensayo de hipersensibilidad por contacto

Para cada uno de estos ensayos se emplearon 10 hembras de 15 semanas de edad. 5 de ellas homocigotas para los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup>, *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> y *c-Met*<sup>fl</sup>, y las restantes 5 homocigotas para los primeros dos alelos y heterocigotas para *c-Met*<sup>fl</sup>. Los animales fueron tratados con tamoxifeno en la dieta

durante 8 semanas a partir del destete. Seis días antes de la inducción de la respuesta de hipersensibilidad los animales fueron pre-sensibilizados mediante administración tópica de 50  $\mu$ L de oxazolona (Sigma) al 2% en acetona-aceite de maíz 4:1 en el abdomen previamente afeitado. La inducción de la hipersensibilidad por contacto se realizó mediante aplicación tópica de 20  $\mu$ L de oxazolona al 1% en las caras interna y externa de la oreja izquierda de cada animal. Por su parte, a la oreja derecha se le aplicó un volumen idéntico del vehículo (acetona-aceite de maíz 4:1). Diariamente se registró el grosor de cada oreja mediante un calibre milimetrado (Caliper) y se comparó con el grosor original para determinar el porcentaje de inflamación inducido. 24 ó 48 h después del tratamiento los animales se sacrificaron, las orejas se fijaron en formalina al 10% y se procesaron para su inclusión en bloques de parafina y análisis por inmunohistoquímica.

La cuantificación del infiltrado inflamatorio se realizó de la manera descrita en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos.

### 3.3 Ensayo de carcinogénesis química

La inducción de tumores mediante tratamiento con agentes químicos consistió en la aplicación tópica de los agentes tumorigénicos DMBA y TPA (Curran, 2001). Para ello se utilizaron 20 hembras homocigotas ( $n=10$ ) o heterocigotas ( $n=10$ ) para el alelo *c-Met*<sup>fl</sup>, todas ellas homocigotas para los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> y alimentadas con dieta tamoxifeno durante 8 semanas consecutivas a partir del destete. Antes de comenzar el tratamiento los animales de ambos grupos recibieron dieta convencional durante cuatro semanas.

La aplicación del agente mutagénico DMBA se realizó en hembras de 12 semanas de edad, un día después de haber depilado el dorso de los animales. Una semana después de la aplicación de DMBA (500  $\mu$ g en 200  $\mu$ L de acetona) se inició el régimen de tratamiento con el agente promotor, que consistió en la aplicación tópica de 10.5  $\mu$ g de TPA (disueltos en 200  $\mu$ L de acetona) todos los martes y jueves durante 25 semanas consecutivas. Una vez por semana el dorso de los ratones fue depilado para favorecer la homogénea distribución y penetración del TPA.

Una vez por semana se cuantificó el número de papilomas en cada animal y la gravedad de dichas lesiones mediante el siguiente sistema de puntuación: papilomas con diámetro menor a 0.2 cm = 1 punto; diámetro entre 0.2 y 0.5 cm = 2 puntos; diámetro entre 0.5 y 1 cm = 3 puntos; diámetro mayor de 1 cm = 4 puntos. Para garantizar la objetividad de los resultados la cuantificación de las lesiones se realizó sin conocer el genotipo de los animales. A partir de los datos cuantitativos se realizó una comparación de medias entre los dos grupos de animales a distintos tiempos de análisis. Siempre que las muestras tuvieran una distribución normal se utilizaron métodos paramétricos, concretamente la prueba *t* de student con un intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico se realizó con el software StatGraphics Plus 5.1 (Stat Point Inc.).

Una vez finalizado el experimento, muestras representativas de las lesiones fueron tomadas y fijadas en formalina al 10% para su posterior procesamiento y análisis mediante inmunohistoquímica sobre cortes de parafina.

## 4. Generación del modelo Tg.CAG-LSL-Katushka

### 4.1 Construcción del plásmido pCAG-LSL-Katushka y generación de ratones transgénicos

El plásmido pCAG-LSL-Katushka se construyó mediante la inserción del ADNc de Katushka, amplificado por PCR a partir del plásmido pTurboFP635-C (Evrogen), en el sitio *NotI* del plásmido reportero pVL1, construido en el CNIO por Vanesa Lafarga del laboratorio del Dr. Ángel Nebreda. El plásmido trazador resultante posee el promotor ubicuo CAG, una secuencia de parada de transcripción (*STOP*) flanqueada por sitios *loxP* (LSL), la secuencia codificante de Katushka y la señal de poliadenilación de la  $\beta$ -globina de conejo.

Mediante una doble digestión *PvuII-SalI* del plásmido pCAG-LSL-Katushka, se obtuvo un fragmento de 4.7 Kb que contiene el transgén en su totalidad. Dicho fragmento fue resuelto por electroforesis en gel de agarosa, purificado a partir del gel mediante un kit comercial (*GeneClean Spin Kit*, MP Biomedicals) y resuspendido en tampón de microinyección (*Water for Embryo Transfer*, Sigma). A continuación el transgén fue microinyectado en el pronúcleo de embriones unicelulares de fondo genético híbrido F1 [(C57BL/6J.OlaHsd)(CBA/J)] mediante técnicas convencionales de transgénesis (Nagy, 2003). Los embriones microinyectados fueron transferidos a hembras pseudo-gestantes que llevaron la gestación a término y dieron a luz camadas en las que se evaluó la presencia de ratones fundadores mediante análisis por PCR y *Southern Blot* a partir de biopsias de cola.

### 4.2 Análisis de la descendencia e identificación de animales transgénicos

La identificación de los ratones transgénicos se realizó mediante genotipado por PCR utilizando los oligonucleótidos: directo, KAT\_F1 (5' AAC GAC CAC CAC TTC AAG TGC 3') y reverso, pVL\_R1 (5' TAG CCA GAA GTC AGA TGC TCA AGG 3'), que en presencia del transgén generan un amplicón de 812 pb. Una vez identificados, los ratones fundadores fueron cruzados con animales de genotipo silvestre y con ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre de manera ubicua o tejido-específica. Siempre que fue necesario, el alelo transgénico de Cre se identificó mediante genotipado por PCR empleando los oligonucleótidos: directo, Teto1 (5' CCG GTT ATT CAA CTT GCA CC 3') y reverso, Teto2 (5' CTG CAT TAC CGG TCG ATG CAA C 3').

### 4.3 Análisis del número de copias y eventos de integración del transgén

La caracterización a nivel genético se realizó mediante análisis por *Southern Blot* según el protocolo descrito en el apartado 1.3 de Materiales y Métodos. Para la identificación de los fragmentos de interés se utilizó una sonda de 331 pb, específica para Katushka, amplificada mediante PCR empleando los oligonucleótidos: directo, KAT\_F1 (5' AAC GAC CAC CAC TTC AAG TGC 3') y reverso, KAT\_R1 (5' GGT GAA CTT CCC ATC CAA CG 3').

El análisis del número relativo de copias integradas en cada línea fundadora se realizó mediante doble digestión *EcoRI/SacI* del ADN genómico extraído de biopsias de cola de ratones hemicigotos para el alelo Tg.CAG-LSL-Katushka previa recombinación. En tal caso, la hibridación con la sonda radiomarcada permite reconocer un fragmento de 2.2 Kb correspondiente a cada copia individual del transgén. Así pues, la intensidad de la banda detectada es proporcional al número de copias integradas.

Por su parte, el análisis de la recombinación inducida tras cruzamiento con ratones que expresan la recombinasa Cre de forma ubicua se realizó mediante doble digestión *EcoRI/SacI* del ADN genómico extraído de biopsias de cola de ratones hemicigotos para los alelos Tg.CAG-LSL-Katushka y Tg.CMV-Cre. En este caso, la sonda radiomarcada permite la identificación de un fragmento de 0.8 Kb que corresponde al alelo trazador recombinado.

El análisis del número de eventos de integración se realizó mediante digestión del ADN genómico de biopsias de cola de ratones hemicigotos para el alelo Tg.CAG-LSL-Katushka previa recombinación con la enzima *XbaI*. La integración de varias copias del transgén, en disposición cabeza-cola, en un único sitio del genoma da lugar a la identificación de una banda de 4.7 Kb común a todos los fundadores generados. Adicionalmente, cada evento de integración dará lugar a la aparición de una banda de tamaño variable en función de la presencia de dianas de restricción para *XbaI* más o menos próximas al sitio de integración.

### 4.4 Evaluación *in vitro* de la actividad trazadora de pCAG-LSL-Katushka

La evaluación *in vitro* de la actividad trazadora se realizó en dos líneas celulares distintas: células ES y células H460 de cáncer de pulmón. Dichas células fueron electroporadas o transfectadas con los plásmidos pCAG-LSL-Katushka, previamente descrito, y CMV-NLSCre, que dirige la expresión constitutiva de la recombinasa Cre precedida de una secuencia de localización nuclear (obtenido del laboratorio de la Dra. Alexandra Joyner). Como control se utilizaron células transfectadas únicamente con el plásmido portador del alelo trazador de la actividad de Cre.

El protocolo consistió en sembrar 750,000 células H460 en placas P60, el día siguiente se lavaron dos veces con medio sin suero y se les añadió 2.5 mL de medio sin suero sobre el que se distribuye por goteo la mezcla de transfección que consiste en 3 µg de cada ADN plasmídico disueltos en un volumen



final de 500  $\mu$ L de medio sin suero al que se añaden 20  $\mu$ L del reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Por su parte,  $5 \times 10^6$  células ES en 800  $\mu$ L de PBS fueron electroporadas con 20 y 50  $\mu$ g de los plásmidos pCAG-LSL-Katushka y CMV-NLSCre, respectivamente en un electroporador BioRad *Gene Pulser II* (240 V y 500  $\mu$ F). Las células transfectadas fueron cultivadas en medio desprovisto de suero durante las siguientes 6 h y luego en medio completo durante una noche. El medio de cultivo utilizado para las células H460 fue RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 15% de suero fetal bovino (Gibco) y penicilina-estreptomicina 50 U/mL-50  $\mu$ g/mL (Gibco). Por su parte, las células ES fueron cultivadas en DMEM/Glutamax-I (Gibco), 2-mercaptoetanol 0.1 mM (Gibco), aminoácidos no esenciales 1X (Gibco), piruvato sódico 1 mM (Gibco), penicilina-estreptomicina 50 U/mL-50  $\mu$ g/mL (Gibco), LIF 1000 U/mL (Chemicon) y suero fetal bovino 15% (Gibco).

La expresión de la proteína fluorescente trazadora se evaluó mediante citometría de flujo dos días después de la transfección. Para ello, se aspiró el medio, se lavaron las células con PBS y se tripsinizaron durante 10 min a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se añadió medio completo y se recuperaron las células en suspensión. Tras centrifugar a 300 g durante 10 min a 4 °C se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS- EDTA 2 mM y albúmina bovina sérica al 0.5%. El análisis por citometría se realizó en un equipo BD LSRFortessa *Cell Analyzer* (BD Biosciences).

## **5. Caracterización y aplicaciones de los modelos Tg.CAG-LSL-Katushka y Tg.CAG-Katushka**

### **5.1 Observación de fluorescencia *in vivo***

#### **5.1.1 Detección de epifluorescencia**

La detección de epifluorescencia en la piel de crías de ratón se realizó en un estereoscopio MZ16F (Leica) equipado con una lámpara de mercurio de alta intensidad (100 W) y un set de filtros para macrofluorescencia Texas Red (filtro de excitación: 560/40; filtro de emisión: 645/75). La captura de imágenes se realizó mediante una cámara DFC 350 FX (Leica) acoplada al estereoscopio.

#### **5.1.2 Detección de fluorescencia *in vivo* mediante técnicas no invasivas**

Para la detección de fluorescencia *in vivo*, tanto en crías como en ratones adultos, se utilizaron los equipos de imagen óptica no invasiva IVIS 200 e IVIS *Spectrum* (Caliper). Los ratones adultos fueron anestesiados previamente mediante inhalación de isoflurano al 2% y se les mantuvo sedados durante la adquisición de imágenes. La adquisición de la señal fluorescente de Katushka en el IVIS 200 se realizó con el filtro de excitación para DsRed (500-550 nm) y un filtro de emisión a 640 nm (ancho de banda 30 nm). Por su parte, en el IVIS *Spectrum* se utiliza un filtro de excitación a 560 nm (ancho de banda 30 nm).

y un filtro de emisión a 640 nm (ancho de banda 20 nm). La adquisición de la señal fluorescente de EGFP se realizó únicamente en el IVIS 200 con el bloque de filtros dispuestos por el fabricante para la observación de GFP (filtro de excitación: 445-490 nm; filtro de emisión: 515-575 nm). En todos los casos se utilizó la máxima intensidad de iluminación, tiempo de adquisición de 1-5 seg y valor f/stop de 1 ó 2.

La adquisición de imágenes y el análisis posterior se realizó mediante el *software Living Image* (Caliper Life Sciences, versión 3.0.4.1). Siempre que fue necesario se definieron regiones de interés (ROIs) para la cuantificación de señal fluorescente proveniente de alguna zona anatómica en particular. Por su parte, para discriminar la señal proveniente de la autofluorescencia endógena, se utilizó un algoritmo matemático que permite la sustracción de la autofluorescencia basal a partir de la comparación cuantitativa de dos imágenes sucesivas del mismo sujeto empleando el mismo filtro de emisión (específico para el fluoróforo en cuestión) y dos diferentes filtros de excitación (el específico del fluoróforo y uno de menor longitud de onda). Los filtros para la detección de autofluorescencia utilizados en el IVIS 200 fueron el DsRed bkg (460 – 490 nm) para Katushka, y el GFP bkg (410 – 440 nm) para EGFP. Por su parte, en el IVIS *Spectrum* se utilizó un filtro de excitación a 520 nm (ancho de banda 30 nm) para la sustracción de la autofluorescencia asociada a la detección de Katushka.

## 5.2 Observación de fluorescencia ex vivo

### 5.2.1 Muestras en preparación completa

La detección de la señal fluorescente en preparaciones completas de órganos de animales adultos se realizó en un estereoscopio de fluorescencia MZ16F (Leica) o en los equipos IVIS 200 o IVIS *Spectrum* (Caliper). Para ello, se extrajeron los órganos y se transfirieron a PBS a 4 °C suplementado con 5% de suero fetal bovino hasta su observación. Los filtros utilizados y los sistemas de detección de imagen son los mismos descritos en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos. Para la adquisición de imágenes de epifluorescencia, el tiempo de exposición se ajustó en función de la intensidad de la señal en cada órgano (páncreas 70 ms; hígado y testículos 300 ms; corazón y cerebro 600 ms; bazo, pulmón y riñón 660 ms).

Por su parte, la detección de fluorescencia en embriones se realizó en un IVIS *Spectrum* (Caliper) o en un microscopio confocal TCS-SP5 AOBS (Leica) equipado con un láser de diodo (561 nm) y objetivo de inmersión 20X HCX PL APO CS 0.7 N.A. Los embriones (E12.5-E15.5) fueron conservados en PBS a 4 °C suplementado con 5% de suero fetal bovino hasta la adquisición de imágenes. Para su observación en el microscopio confocal, los embriones se colocaron entre dos anillos metálicos provistos con cubreobjetos circulares de 25 mm (cámara Attotfluor, Invitrogen).

### 5.2.2 Criosecciones

La observación de fluorescencia de Katushka en preparaciones histológicas se realizó sobre criosecciones. Para ello los ratones fueron anestesiados con xilacina/ketamina (10 mg/Kg y 100 mg/Kg, respectivamente) por vía IP 20 min antes de proceder a la perfusión intracardíaca de 30 mL de PBS y a continuación 50 mL de PFA al 4%. A continuación se diseccionaron los órganos y se fijaron en PFA al 4% durante 2 h a temperatura ambiente. Una vez fijados se transfirieron a soluciones de sucrosa de concentración creciente (10, 20 y 30%) a 4 °C, el cambio de una solución a la siguiente se realizó una vez que los órganos precipitaran. Finalmente, las muestras fueron incluidas en criomoldes plásticos y se les cubrió con OCT (Tissue-Tek). Inmediatamente se transfirieron a nieve carbónica y una vez solidificados se conservaron a -80 °C. En un criostato CM1900 (Leica) se obtuvieron secciones de 10 µm de grosor en portaobjetos de vidrio (Superfrost, Thermo Scientific), se dejaron secar durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación se contratiñeron con DAPI (2 µg/mL en PBS – Tween-20 al 0.05%). Tras lavar con PBS (2 x 5 min) fueron montadas en *ProLong Gold Antifade* (Molecular Probes) para su observación en un microscopio de fluorescencia Axio Imager.Z1 (Carl Zeiss) equipado con bloque de filtros Texas Red o en un microscopio confocal TCS-SP5 AOBS (Leica) con objetivos de inmersión 20X HCX PL APO CS 0.7 N.A. ó 63X HCX PL APO 1.30 N.A.

### 5.2.3 Mórulas y blastocistos

Las mórulas y blastocistos fueron obtenidos de hembras gestantes a E2.5 o E3.5 mediante lavado de los oviductos y/o cuernos uterinos con medio M2 (Sigma). Los embriones preimplantacionales fueron observados directamente o cultivados en medio KSOM (Specialty Media) cubierto por aceite mineral (Sigma) en un incubador a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Todas las imágenes de fluorescencia de mórulas y blastocistos fueron adquiridas en un microscopio confocal TCS-SP5 AOBS (Leica) con un objetivo multiinmersión 20X HCX PL APO CS 0.7 N.A.

### 5.2.4 Retinas

Para la detección de fluorescencia nativa en la retina del ratón y el análisis de marcadores endoteliales por inmunofluorescencia, los globos oculares fueron fijados en PFA al 4% durante 2 h a 4 °C. A continuación se procedió a la disección de la retina tal como se describe en el apartado 2.4.1 de Materiales y Métodos.

Para el análisis mediante inmunofluorescencia, las retinas previamente diseccionadas fueron bloqueadas en solución de bloqueo (Triton X-100 0.3% y albúmina bovina sérica 1% en PBS) a 4 °C durante al menos 12 h. A continuación, se aspiró la solución de bloqueo y las retinas se incubaron a 4 °C durante una noche en 100 µL de solución de bloqueo suplementada con 2% de suero de burro y los anticuerpos primarios. Para la detección de vasos sanguíneos se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-CD31 (Abcam) en dilución 1:100 y los vasos linfáticos fueron detectados con el anticuerpo

policlonal de cabra anti-VEGFR3 (R&D Systems, cat. AF743) en dilución 1:50. El día siguiente las retinas fueron lavadas (5 x 20 min) con 2 mL de la solución de lavado (dilución 1:2 de solución de bloqueo en PBS) y a continuación se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente en 100 µL de solución de bloqueo suplementada con 2% de suero de burro y la dilución de los anticuerpos secundarios: burro anti-conejo (Alexa Fluor 488, dilución 1:500) y burro anti-cabra (Alexa Fluor 555, dilución 1:500). Tras la incubación las retinas fueron lavadas (4 x 20 min) con 2 mL de la solución de lavado a temperatura ambiente y acto seguido con 2 mL de PBS (2 x 5 min). Para teñir los núcleos, las retinas se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en una solución de Tween-20 0.05% en PBS con DAPI a una concentración final de 1 µg/mL. A continuación las retinas se lavaron en PBS (2 x 5 min) y se montaron en portaobjetos (LineaLab). El medio de montaje utilizado para las tinciones fluorescentes fue *ProLong Gold Antifade* (Molecular Probes). La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio confocal Leica TCS-SP5 AOBS (Leica) equipado con láseres UV (405), Argón (488), Diodo (561) y HeNe (633) y un láser blanco con longitud de onda ajustable. Se utilizaron objetivos de inmersión 20X HCX PL APO CS 0.7 N.A. y 40X HCX PL APO 1.30 N.A. La captura se realizó con el *software* LAS AF (Leica, versión 2.1) y el procesado posterior de las imágenes con Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., versión 12.0 x32).

### 5.2.5 Detección de fluorescencia nativa e inmunofluorescencia en piel

Para la detección de fluorescencia nativa en la piel del ratón y el análisis de marcadores endoteliales por inmunofluorescencia se utilizó la piel del pabellón auricular. A partir de las orejas de ratones de 3 semanas de edad se diseccionó la piel que recubre la cara exterior del pabellón auricular eliminando el cartílago, que permanece mayormente unido a la cara interior del pabellón. Inmediatamente, la piel se transfirió a PBS de forma tal que la cara interior del tejido contactara con la superficie del líquido y se expandiese por capilaridad. A continuación se aspiró el PBS y se sustituyó por PFA al 2% para fijar las muestras durante 2 h a temperatura ambiente, luego se lavó 3 veces con PBS y se conservó en dicha solución a 4 °C o se montó en *ProLong Gold Antifade* (Molecular Probes) para la observación de la señal nativa de Katushka.

Para la inmunodetección de marcadores endoteliales, la piel fue lavada durante 10 min en PBS y Triton X-100 0.3% (PBST) a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 2 mL de la solución de bloqueo (PBST y 3% de leche desnatada) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyeron en 200 µL de la solución de bloqueo y se incubaron a 4 °C durante una noche. El día siguiente las muestras se lavaron con PBST durante 2 a 3 h cambiando la solución cada 30 min y se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos en un volumen final de 200 µL de PBST y 1% de leche desnatada. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente se lavaron de la manera descrita y se montaron en *ProLong Gold Antifade* (Molecular Probes) para su observación. La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio confocal Leica TCS-SP5 AOBS (Leica) equipado con objetivos de inmersión 20X HCX PL APO CS 0.7 N.A. y 40X HCX

PL APO 1.30 N.A. La captura se realizó con el *software* LAS AF (Leica, versión 2.1) y el procesamiento posterior de las imágenes con Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., versión 12.0 x32).

Los siguientes anticuerpos primarios fueron utilizados en las inmunodetecciones: policlonal de conejo anti-CD31 (abcam, 28364) en dilución 1:100, policlonal de conejo anti-Tie2 (Santa Cruz Biotechnology, C-20) en dilución 1:50, policlonal de conejo anti-Lyve1 (abcam, 768540) en dilución 1:200, policlonal de cabra anti-VEGFR3 (R&D Systems, AF743) en dilución 1:50. Por su parte, los anticuerpos secundarios utilizados fueron: burro anti-conejo (Alexa Fluor 488, dilución 1:300) y burro anti-cabra (Alexa Fluor 555, dilución 1:500).

### 5.3 Detección de fluorescencia mediante citometría de flujo

La preparación de suspensiones celulares se describió en el apartado 2.3.1 de Materiales y Métodos. La detección de marcadores de superficie se realizó con los siguientes anticuerpos monoclonales de rata (todos de BD Pharmingen): anti-CD4 conjugado a ficoeritrina (PE), anti-CD8 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD19 conjugado a aloficocianina (APC), anti-Gr1 conjugado al tándem ficoeritrina-cianina 7 (PE-Cy7) y anti-CD45 conjugado a APC. Todas las tinciones se realizaron sobre  $10^6$  células en 200  $\mu$ L de tampón de análisis durante 30 min a 4 °C previo bloqueo de los receptores Fc $\gamma$  como ha sido descrito anteriormente (ver apartado 2.3.2 de Materiales y Métodos).

La adquisición de datos fue realizada en un BD LSRFortessa *Cell Analyzer* (BD Biosciences) equipado con lasers de longitud de onda de 355, 488, 561 y 640 nm. Para excluir agregados celulares se recurrió a análisis de características de superficie y a tinción con DAPI para discriminar las células muertas. Se colectaron al menos 50,000 eventos únicos de células vivas. Los datos fueron analizados con el *software* FlowJo (Treestar, version 9.0.2).

### 5.4 Ensayos de xenotransplante

#### 5.4.1 Líneas celulares

Para los ensayos de xenotransplante se utilizaron células ES de la línea R1 transfectadas con un plásmido que expresa EGFP (cedidas por el laboratorio del Dr. Andras Nagy) y células tumorales SK-MEL-146 de melanoma humano transfectadas con un plásmido que expresa EGFP (cedidas por el laboratorio de la Dra. Marisol Soengas). Las células ES se cultivaron de la manera indicada en el apartado 1.2 de Materiales y Métodos. Las células SK-MEL-146 se cultivaron en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina 50 U/mL-50  $\mu$ g/mL (Gibco). Antes de inocular las células en ratones se seleccionó un *pool* con expresión homogénea y elevada de fluorescencia mediante análisis por citometría en un FACS-Sorter (Aria BD).

### 5.4.2 Inoculación de líneas celulares en ratones atímicos desnudos

Para los ensayo de xenotransplante se utilizaron hembras heterocigotas para el alelo Tg.CAG-Katushka y homocigotas para *Foxn1*<sup>nu</sup> de 15-20 semanas de edad (n=6). A cada animal se inyectó por vía subcutánea  $2 \times 10^6$  células ES en el flanco izquierdo y  $2 \times 10^6$  células SK-MEL-146 en el flanco derecho, obtenidas a partir de cultivos subconfluentes. Como control negativo se utilizaron hembras homocigotas para *Foxn1*<sup>nu</sup> sin expresión de Katushka (n=3).

### 5.4.3 Monitorización *in vivo* y *ex vivo* del crecimiento tumoral

La monitorización *in vivo* del crecimiento tumoral se llevó a cabo mediante la adquisición de señal fluorescente para Katushka y EGFP en un equipo IVIS 200 (Xenogen) siguiendo la metodología descrita en el apartado 5.1.2 de Materiales y Métodos.

Para la observación microscópica del microambiente tumoral los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub> tres semanas después de la inoculación de las células. Los tumores fueron diseccionados quirúrgicamente y fijados en PFA al 4% durante una noche, a continuación fueron lavados en PBS e incluidos en criobloques con OCT (Tissue-Tek). Inmediatamente se transfirieron a nieve carbónica y una vez solidificados se conservaron a -80 °C. En un criostato CM1900 (Leica) se obtuvieron secciones de 40 µm de grosor en portaobjetos de vidrio (Superfrost, Thermo Scientific), se dejaron secar al aire durante media hora y se montaron directamente en *ProLong Gold Antifade* (Molecular Probes). La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio confocal TCS-SP5 AOBS (Leica) equipado con un láseres de argón (488 nm) y diodo (561 nm) y objetivo de inmersión 20X HCX PL APO CS 0.7 N.A.

---

# RESULTADOS

---

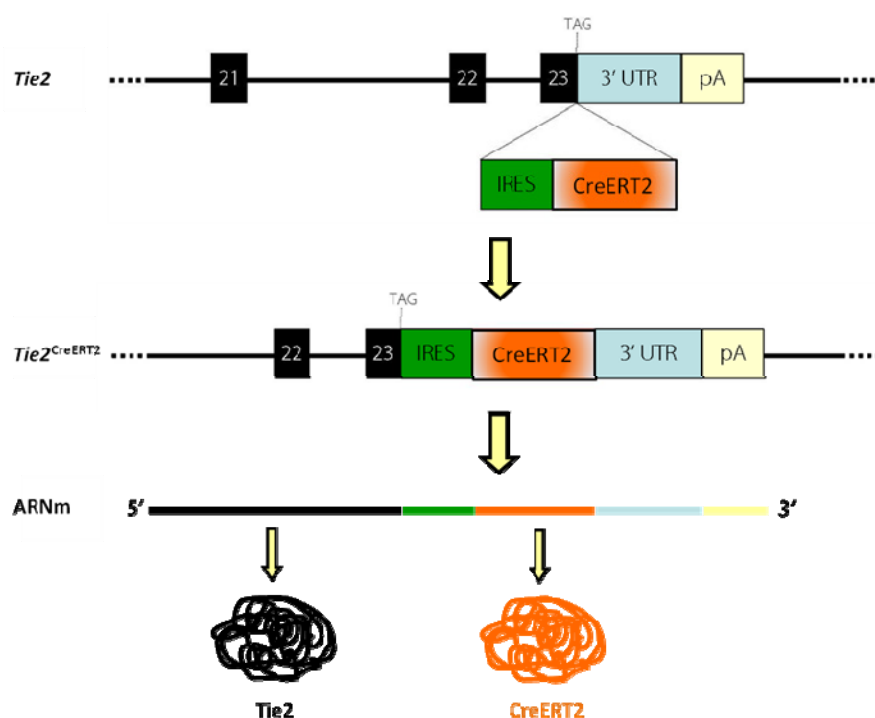




## 1. Generación del modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup>

El análisis de la función de un gen en particular, en un contexto tisular determinado, dentro de un organismo vivo, es posible gracias al desarrollo de sistemas experimentales que permitan eliminar, modificar o restaurar la actividad de dicho gen específicamente en el tejido de interés. Un nivel de control adicional consiste en poder definir en qué momento tendrán lugar dichas modificaciones. En este sentido, uno de los objetivos fundamentales del presente trabajo consiste en generar un modelo murino que permita la activación o inactivación condicional de genes, a través de la recombinasa inducible CreERT2, específicamente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y de una forma controlada en el tiempo. Para garantizar la especificidad endotelial de la recombinación, se ha diseñado un modelo en el que la expresión de CreERT2 está regulada por las secuencias endógenas que dirigen la transcripción del gen *Tie2*. Como se describió anteriormente (ver apartado 5.2 de Introducción), el receptor de membrana Tie2 es un reconocido marcador de células endoteliales y un importante mediador de señales durante la respuesta angiogénica y el mantenimiento del fenotipo quiescente de la vasculatura sanguínea.

Mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias (células ES) de ratón se dirigió



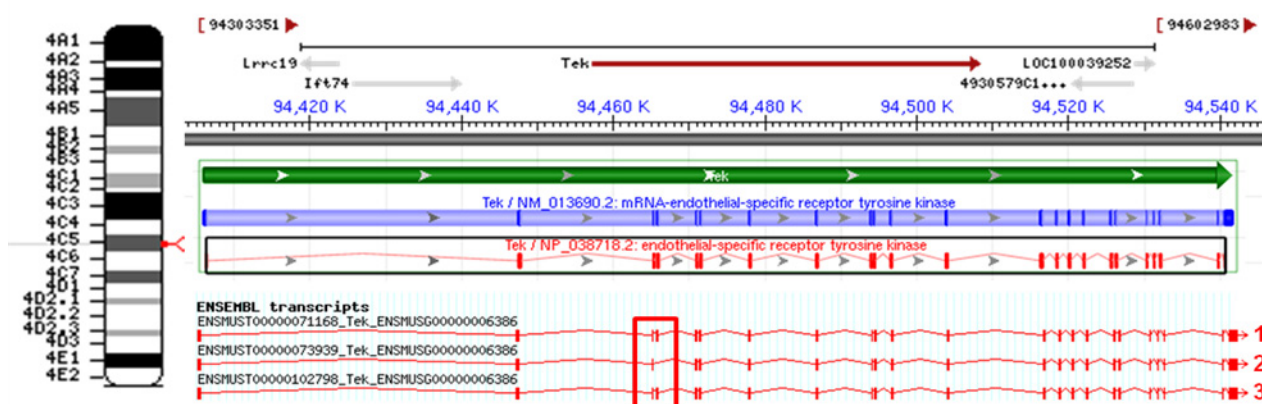
**Figura 9. Estrategia de generación del modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup>.** Introducción de la secuencia codificante de CreERT2 entre el codón de terminación (TAG) y la región 3' no traducida (3' UTR) del gen *Tie2*, precedida por un elemento de entrada interna de ribosoma (IRES), de forma tal que se genera un ARNm bicistónico que codifica para Tie2 y CreERT2 bajo el control transcripcional endógeno del locus *Tie2*.

la inserción de la secuencia codificante de la recombinasa inducible CreERT2, precedida por una secuencia de entrada interna de ribosoma (IRES), entre el codón de terminación y la secuencia de poliadenilación del gen que codifica para Tie2. De esta manera la transcripción del locus de *Tie2* da lugar a un mensajero bicistónico que permite la expresión simultánea de dos proteínas: Tie2 y CreERT2, ambas bajo idéntica regulación transcripcional y sin alterar la secuencia codificante del gen *Tie2* (Figura 9).

## 1.1 Construcción del vector de *targeting* Tie2<sup>IRES-CreERT2</sup>

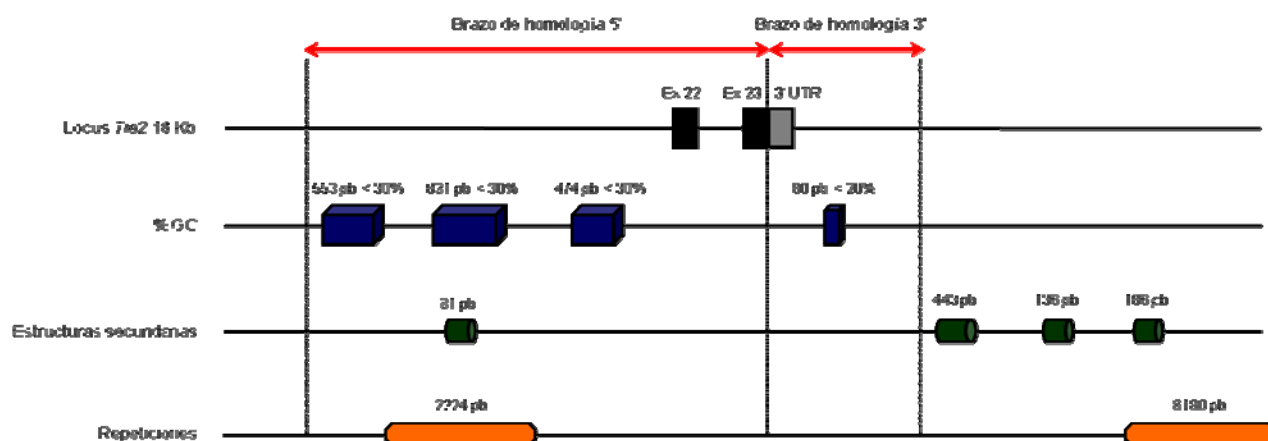
### 1.1.1 Análisis del locus *Tie2*

El gen *Tie2* murino (*GenBank accession* # NM\_013690) está formado por 23 exones y 22 intrones y se localiza en la región C5 del cromosoma 4 (Figura 10). La secuencia de dicho gen ha sido resuelta en su totalidad en la cepa C57BL/6J y se encuentra disponible en la base de datos de Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org), ENSMUSG000000006386). Los genes más próximos a *Tie2* se encuentran a 46.2 Kb en dirección 5' y a 32.3 Kb en dirección 3' por lo que es improbable que la inserción de secuencias exógenas en la región 3' no traducida de *Tie2* provoque algún tipo de desregulación en el control de los genes vecinos.



**Figura 10. Representación esquemática de la organización del locus *Tie2* murino.** A la izquierda se muestra la localización del gen en la región C5 del cromosoma 4; en el extremo superior el contexto genómico y los genes más próximos; en la región intermedia el tamaño y localización específica del gen, así como la estructura del mensajero convencional y proteína a la que da origen; finalmente, en el extremo inferior se detallan las diferentes formas de *splicing* descritas. Figura compuesta a partir de imágenes disponibles en las bases de datos de ENSEMBL y NCBI.

El análisis de la secuencia del locus *Tie2*, en cuanto al contenido de GC y su distribución, la presencia de repeticiones y la existencia de zonas con estructuras secundarias, permite identificar regiones que condicionan la construcción del vector de *targeting*. Al realizar un análisis de una región de 8 Kb en sentido 5' respecto al exón 23 se identifican: a) tres regiones con un contenido de GC inferior al 30% que se extienden sobre 553, 891 y 474 pb; b) una estructura secundaria putativa de 81 pb; y c) una repetición larga de 2224 pb en la región anterior al exón 22. Por su parte, el análisis de una región de 8 Kb posterior al exón 23 permite identificar: a) una región de 80 pb con un contenido de GC inferior al 20%; b) tres regiones con posible estructura secundaria que se extienden sobre 443, 136 y 186 pb; y c) una repetición larga de 6180 pb (Figura 11). Las zonas con un contenido muy alto o muy bajo de GC son un mal sustrato para la amplificación por PCR y dificultan la clonación o pasos posteriores de genotipado. Por su parte, la presencia de zonas repetitivas puede tener un impacto negativo sobre la frecuencia de recombinación homóloga ya que facilita la integración de la construcción en múltiples sitios del genoma que comparten una secuencia común (Kobayashi *et al.*, 1998). Finalmente, la formación de estructuras secundarias (*loops*, *hairpins*) puede afectar tanto la amplificación por PCR como la



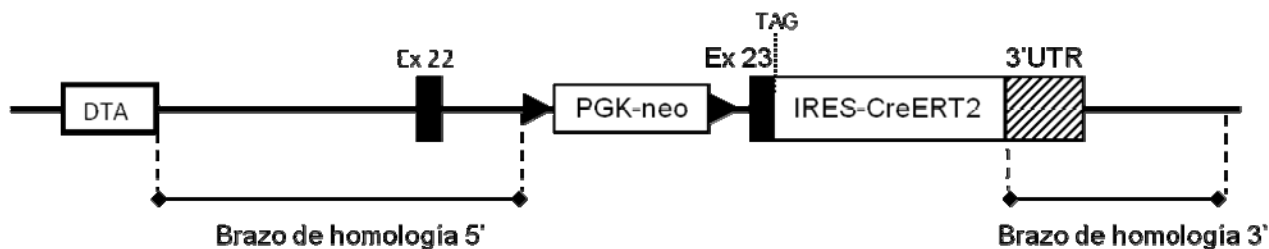
**Figura 11. Análisis de la secuencia del locus *Tie2*.** Localización de las regiones con bajo contenido de GC, áreas que pueden formar estructuras secundarias y secuencias repetitivas en las zonas que dan origen a los brazos de homología. Los diagramas no están representados a escala.

frecuencia de recombinación homóloga. Todas estas características de la secuencia en torno al locus de *Tie2* son relevantes para el diseño del vector de *targeting*.

### 1.1.2 Diseño del vector de *targeting*

Los brazos de homología del vector se diseñaron con el objetivo de dirigir la inserción de la fusión IRES-CreERT2 inmediatamente a continuación del codón de terminación (TAG) de la secuencia codificante de *Tie2*. Dado que para favorecer la recombinación homóloga frente a la integración al azar es, en general, recomendable que la suma de la longitud de ambos brazos de homología sea de 5-10 Kb como mínimo y que cada brazo tenga un tamaño mínimo de 2 Kb, no existe alternativa posible para evitar totalmente las regiones conflictivas cercanas al exón 23 (ver figura 11). Así pues, finalmente se decidió diseñar un brazo de homología largo (5') que se extiende 6.2 Kb hacia la región 5' del exón 23 y un brazo de homología corto (3') que se extiende 2 Kb hacia la región 3' del exón 23 y que evita tanto las tres posibles zonas con estructura secundaria como la repetición de 6180 pb.

Además de los brazos de homología y la secuencia IRES-CreERT2, el vector de *targeting* diseñado (Figura 12) contiene el marcador de selección positiva PGK-neo, que expresa el gen de resistencia a neomicina, neomicina fosfotransferasa de *E. coli*, bajo el control transcripcional del promotor del gen *Pgk1*, que codifica para la fosfoglicerato quinasa de ratón. Dicho marcador, en presencia continuada de geneticina, condiciona la supervivencia celular a la integración de la construcción en el genoma; además, dado que se encuentra flanqueado por sitios *frt*, puede ser escindido mediante recombinación mediada por la recombinasa Flpe (ver apartado 1.4 de Resultados). Tras el casete de selección positiva se encuentra el exón 23 que contiene el codón de terminación de *Tie2* (TAG); a continuación, la secuencia codificante de la fusión IRES-CreERT2 y la secuencia de poliadenilación de la región 3' no traducida del gen *Tie2*. Adicionalmente, el vector de *targeting* contiene la secuencia codificante de la toxina diftérica  $\alpha$  (DTA) como marcador de selección negativa. Dicho marcador facilita la selección de clones recombinantes homólogos ya que limita la supervivencia de



**Figura 12. Estructura general del vector de *targeting*.** Se indican las zonas que constituyen los brazos de homología, el marcador de selección negativa (DTA), el marcador de selección positiva (PGK-neo) flanqueado por sitios *fit* (triángulos negros) y la fusión IRES-CreERT2 entre el codón de terminación del exón 23 (TAG) y la secuencia de poliadenilación de la región 3' no traducida (3'UTR). Los componentes de la figura no están representados a escala.

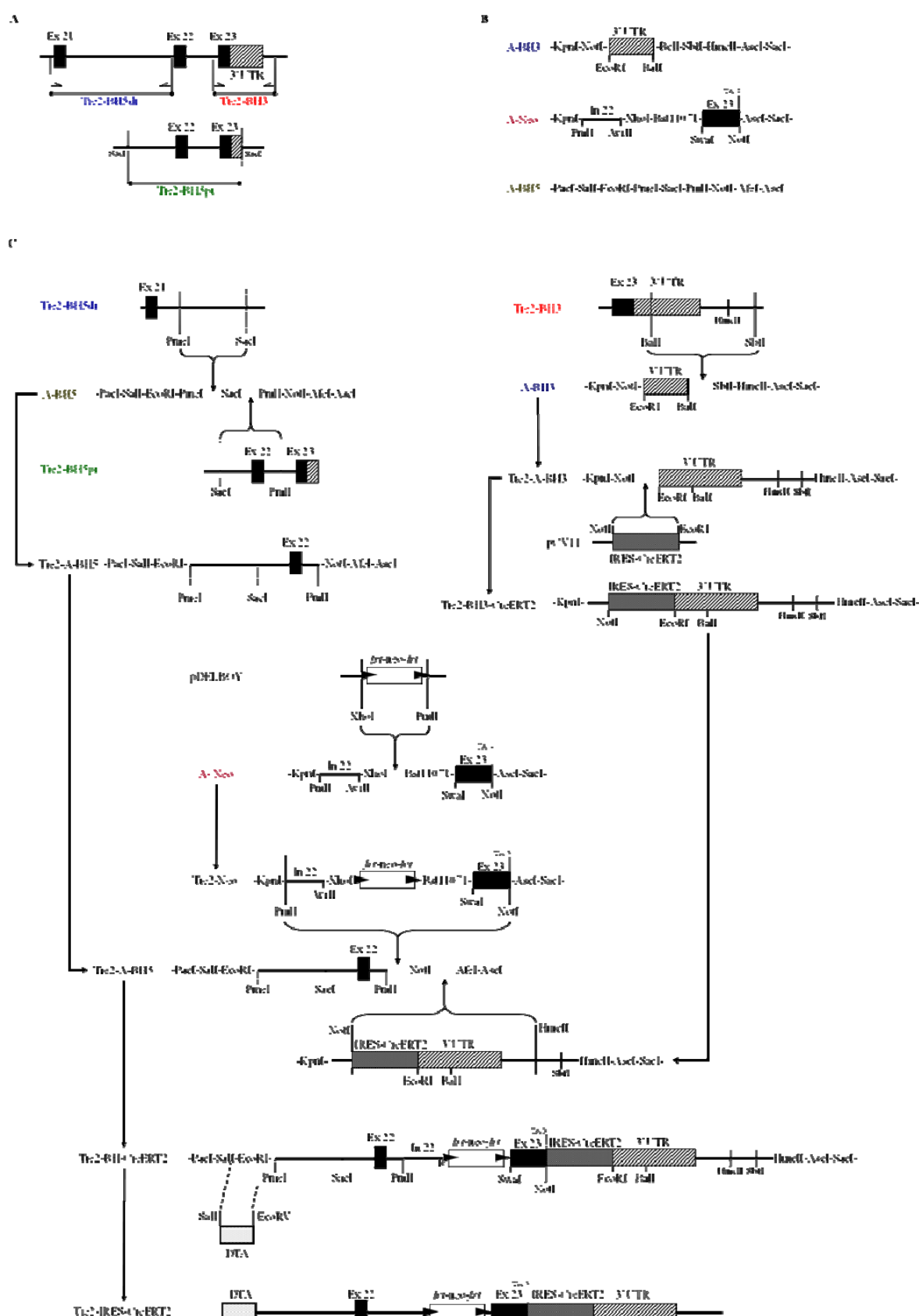
aquellos clones que incorporan la construcción por mecanismos que implican recombinación no homóloga por los extremos del vector linearizado e integración al azar.

### 1.1.3 Construcción del vector de *targeting*

El procedimiento específico para la construcción del vector de *targeting* se explica en detalle en el apartado 1.1 de Materiales y Métodos y se representa gráficamente en la figura 13. Una vez clonados todos los componentes del vector, se procedió a comprobar la secuencia de los mismos y a compararla con la secuencia genómica disponible en Ensembl, con especial atención a los brazos de homología y las regiones codificantes.

La comparación del brazo de homología 5' con la secuencia genómica correspondiente (intrón 21 y exón 22) permitió establecer un nivel de identidad general del 99.5% que llega a ser del 100% si el análisis se restringe a la secuencia codificante del exón 22. Por su parte, la comparación del brazo de homología 3' con la secuencia genómica correspondiente (región 3' no traducida y señal de poliadenilación) arrojó un nivel de identidad general del 99.7% y del 99.9% para la secuencia de poliadenilación; en dicha secuencia encontramos un polimorfismo previamente reportado (Entrez SNP rs13474059). Finalmente, cabe destacar que el exón 23 (195 pb contenidas entre el marcador de selección positiva y la fusión IRES-CreERT2) mantiene un 100% de identidad respecto a la secuencia genómica anotada en Ensembl.

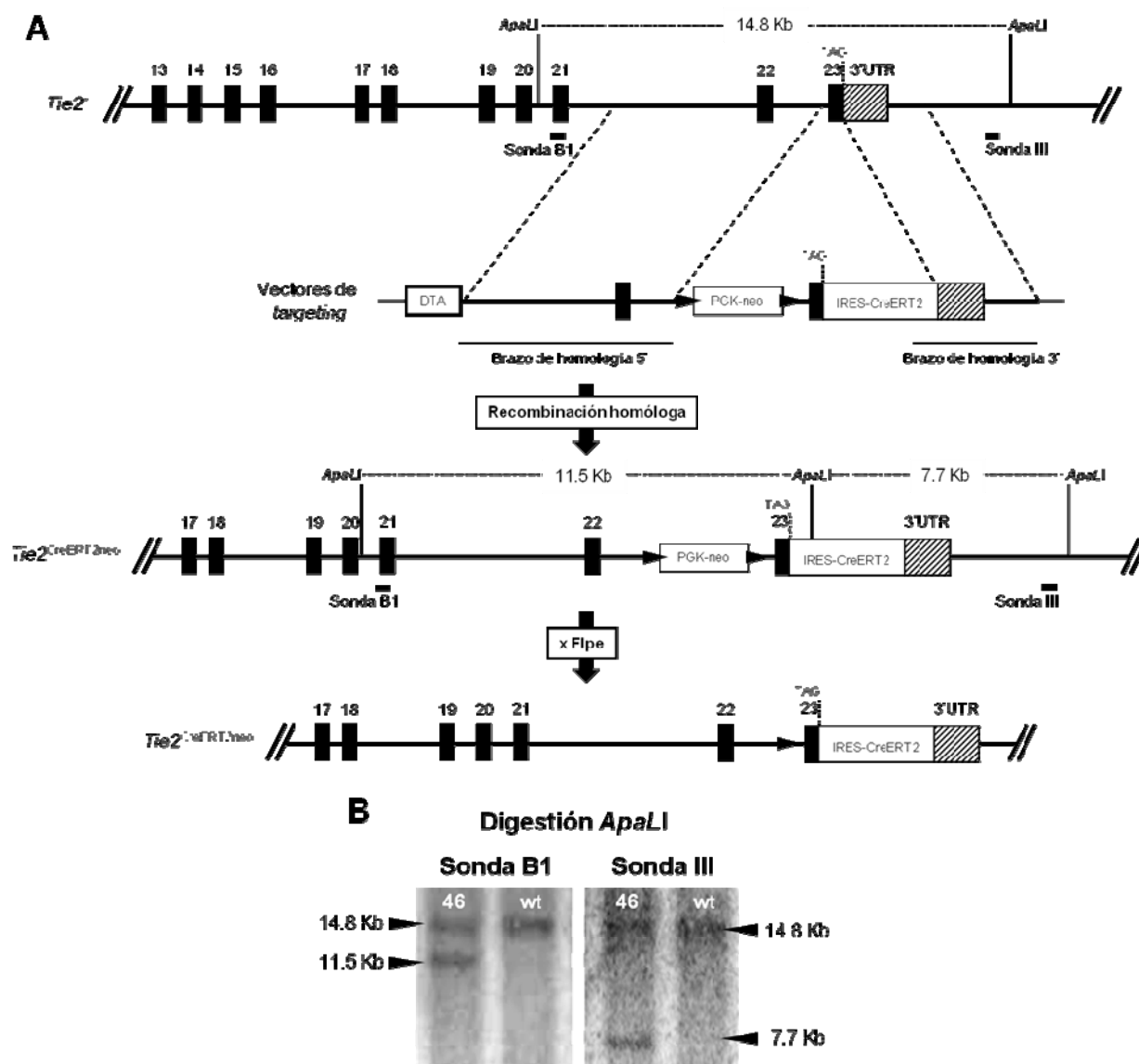
Así pues, la sustitución de las secuencias genómicas en las células ES por las secuencias contenidas en los vectores de *targeting* no debe introducir ninguna modificación en las regiones codificantes y mantendrá un alto grado de similitud general respecto al contexto original. Las ligeras variaciones encontradas corresponden a polimorfismos reportados previamente en regiones no codificantes y asociadas a distintos fondos genéticos. En tal sentido cabe destacar que las secuencias utilizadas para la construcción de los brazos de homología proceden de fondo genético 129SvPas, mientras que el utilizado para la anotación en los repositorios genómicos citados es C57BL/6J.



**Figura 13. Construcción del vector de *targeting*.** A. Clonación de secuencias genómicas que dan origen a los brazos de homología. B. Secuencias adaptadoras diseñadas. C. Pasos sucesivos de clonación para la construcción del vector de *targeting* Tie2-IRES-CreERT2. Las figuras no están representadas a escala. Detalles adicionales en el apartado 1.1 de Materiales y Métodos.

## 1.2 Obtención y selección de clones recombinantes homólogos

El vector de *targeting* se linearizó y se introdujo en células ES de la línea V6.4 F1 (129S4/SvJae x C57BL/6J) mediante electroporación, tal como se describe en el apartado 1.2 de Materiales y Métodos. Tras la electroporación de las células ES, el vector de *targeting* dirige la introducción, mediante recombinación homóloga, de las secuencias flanqueadas por los brazos de homología en un alelo del gen *Tie2*, entre el codón de terminación y la región 3' no traducida (Figura 14 A). Tras la electroporación de las células ES, se seleccionaron 288 colonias resistentes a genética y se procedió a la identificación de clones recombinantes homólogos mediante análisis por *Southern Blot* (ver apartado 1.3 de Materiales y Métodos y figura 14 B).



**Figura 14. Recombinación homóloga, estrategia de análisis por *Southern Blot* y eliminación del casete de selección positiva.** A. Representación esquemática del alelo silvestre de *Tie2*, el vector de *targeting*, el alelo recombinante homólogo y el alelo *knockin* funcional. El patrón de restricción de *Apa*LI permite diferenciar el alelo silvestre (14.8 Kb) del alelo recombinante (11.5 ó 7.7 Kb) empleando las sondas genómicas B1 o III (representadas con rectángulos negros). B. Análisis por *Southern Blot* para la identificación de clones recombinantes homólogos (*Tie2*<sup>CreERT2neo</sup>) según la estrategia descrita. Se muestra un clon recombinante homólogo (46) y uno de genotipo silvestre (wt).

De esta manera, tras digestión del ADN genómico con la enzima *Apa*LI y mediante hibridación con sondas capaces de identificar fragmentos de distinto tamaño según se trate de células ES de genotipo silvestre o de células con un alelo recombinante, se identificaron 4 clones recombinantes homólogos entre las 288 colonias analizadas, lo cual representa una frecuencia de recombinación homóloga del 1.39%. En la figura 14 B se muestra un clon representativo del evento de recombinación identificado por *Southern Blot*.

### 1.3 Generación de quimeras y transmisión en la línea germinal

Tras la evaluación del cariotipo y la confirmación de ausencia de micoplasma, se seleccionó entre los clones recombinantes homólogos el clon ESRD8.46, con cariotipo euploide (> 75% de células con 40 cromosomas en metafase) y se inyectó en blastocistos murinos para la generación de quimeras tal como se describe en el apartado 1.4 de Materiales y Métodos. Dado que las células ES proceden de una línea de fondo genético híbrido con pigmentación agouti (A/a) y se microinyectan en blastocistos de fondo genético puro C57BL/6J y pigmentación negra (a/a), es posible establecer el porcentaje de quimerismo mediante análisis de la pigmentación de las crías; así pues, a mayor cantidad de zonas de coloración agouti, mayor será la contribución de las células ES a dicha quimera. Según este criterio se generaron dos quimeras macho con una contribución del 80% y del 100% (Tabla 2).

Células ES	Blastocistos inyectados	Número de células	Blastocistos transferidos	Número de receptoras	Crías nacidas	Número de Quimeras	Grado de quimerismo
ESRD8.46	85	5-9	85	8	4	2 machos	80 y 100%

**Tabla 2. Generación de quimeras por microinyección.** Tras dos sesiones de microinyección del clon recombinante homólogo ESRD8.46, se obtuvieron 2 quimeras macho. El grado de quimerismo se evaluó mediante análisis de pigmentación.

En virtud de su pluripotencia, las células ES son capaces de contribuir a cualquier tipo celular del organismo del ratón incluida la línea germinal. En la medida que las células ES recombinantes contribuyan a la línea germinal de las quimeras, éstas serán capaces de transmitir la modificación a su descendencia. Para analizar la contribución de las células ES a la línea germinal de las quimeras, éstas se cruzaron con hembras C57BL/6J y se valoró la cantidad de crías con pigmentación agouti en la descendencia (transmisión de pigmentación). Adicionalmente, todas las crías fueron genotipadas por PCR (ver apartado 1.5 de Materiales y Métodos) para identificar aquellas que habían heredado el alelo recombinante *Tie2*<sup>CreERT2neo</sup> (transmisión de la mutación). De las 32 crías analizadas, 17 (53.1%) heredaron la modificación genética (Tabla 3) y, por tanto, fueron heterocigotas (+/KI) para el alelo *Tie2*<sup>CreERT2neo</sup>. Dicho porcentaje es el esperado dado que no se prevé que el alelo recombinante induzca letalidad embrionaria en heterocigosis.

Id. Quimeras	Grado de quimerismo	Crías	Crías con pigmentación agouti	Crías que portan la modificación	% transmisión pigmentación	% transmisión modificación
BHK 1	80%	16	-	-	43,8	43,8
BHK 2	100%	16	10	10	62,5	62,5

**Tabla 3. Análisis de transmisión de las quimeras.** Las dos quimeras obtenidas se cruzaron con hembras de genotipo silvestre y se evaluó su capacidad para transmitir la pigmentación agouti y la modificación genética introducida.

## 1.4 Eliminación del casete de selección PGK-neo

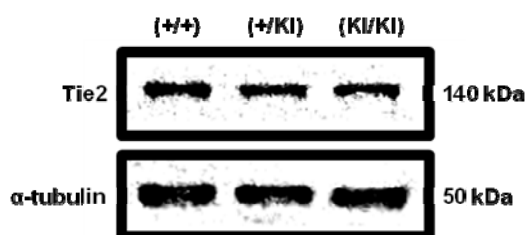
Una vez alcanzada la madurez sexual (6-8 semanas), los ratones heterocigotos *Tie2*<sup>CreERT2neo</sup> se cruzaron con ratones transgénicos Tg.CAG-Flpe (Rodríguez *et al.*, 2000). Dicha línea expresa la recombinasa Flpe de forma ubicua, constitutiva y en la línea germinal, bajo el control del promotor híbrido CAG (promotor de  $\beta$ -actina de pollo y secuencia potenciadora inmediata temprana de citomegalovirus). La recombinasa Flpe cataliza la eliminación de secuencias flanqueadas por sitios diana *frt*, por lo tanto, en el alelo *Tie2*<sup>CreERT2neo</sup> produce la escisión del marcador de selección positiva PGK-neo y con ello la generación del alelo funcional *Tie2*<sup>CreERT2</sup> (Figura 14). Los cruces se establecieron entre ratones *Tie2*<sup>CreERT2neo</sup> (+/KI) y ratones Tg.CAG-Flpe (T/T). Una vez identificados los ratones portadores del alelo escindido *Tie2*<sup>CreERT2</sup> (+/KI) (9 de 15 animales, 60%), mediante genotipado por PCR, éstos se cruzaron entre sí para obtener animales portadores del alelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> en homocigosis (KI/KI). La frecuencia de nacimiento de crías homocigotas para *Tie2*<sup>CreERT2</sup> fue la esperada según la herencia mendeliana (25%), lo cual evidencia que la presencia de la modificación en homocigosis no es deletérea durante el desarrollo embrionario. La línea se mantiene en un fondo genético mixto 129S4/SvJae, C57BL/6J.

## 2. Caracterización del modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup>

### 2.1 Análisis de la expresión del gen *Tie2* después de la recombinación homóloga

Si bien la introducción de la fusión IRES-CreERT2, específicamente en la región 3' no traducida del gen *Tie2* según la estrategia descrita, no debería alterar la expresión del gen endógeno, no se puede descartar que la generación de un ARN mensajero bicistrónico pueda modificar la expresión de *Tie2* debido a cambios en la estabilidad del transcrito o a modificaciones en la eficiencia de su traducción. Por ello, una vez establecido el modelo, se comprobó, mediante inmunodetección de proteínas (*Western Blot*, ver apartado 1.6 de Materiales y Métodos), que los niveles de expresión de *Tie2* permanecen inalterados en animales portadores del alelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> en homocigosis, respecto a aquellos heterocigotos o de genotipo silvestre. Dicho análisis de expresión se llevó a cabo en extractos totales obtenidos de embriones a día 13.5 de desarrollo embrionario (E13.5) ya que en éstos los niveles de expresión de *Tie2* son altos debido al elevado índice de neovascularización existente. Los resultados obtenidos (Figura 15) evidencian que la presencia del alelo recombinante *Tie2*<sup>CreERT2</sup>, incluso en





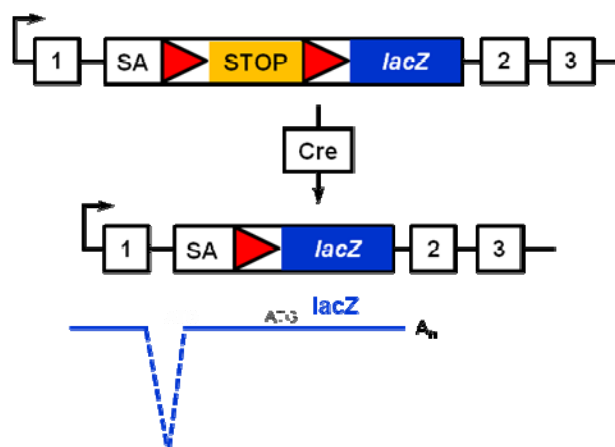
**Figura 15. Análisis de la expresión de Tie2 mediante Western Blot.** 100 µg de extracto proteico total obtenido de embriones a E13.5 de los genotipos indicados se resolvieron por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 7.5% y se hibridaron con un anticuerpo anti-Tie2. Como puede observarse, la modificación dirigida del locus *Tie2* no tiene efecto sobre los niveles de expresión del receptor.

homocigosis, no provoca una modificación detectable, por *Western Blot*, en los niveles de expresión endógenos del receptor. Así pues, la cantidad de proteína Tie2 en animales silvestres, heterocigotos u homocigotos para la construcción es prácticamente idéntica.

## 2.2 Especificidad y eficiencia de la recombinación mediada por Cre

### 2.2.1 Cruce con la línea *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>

Con el objetivo de comprobar que la expresión de la recombinasa CreERT2 reproduce el patrón de expresión del gen *Tie2*, se procedió a cruzar entre sí las líneas *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>. La línea *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> (Soriano, 1999) ha sido ampliamente utilizada como línea trazadora de la actividad de Cre; en ella el gen *lacZ* (que codifica la enzima β-galactosidasa bacteriana), precedido por una secuencia que incluye señales de terminación de la transcripción (secuencia *STOP*) flanqueada por sitios *loxP* (*loxP-STOP-loxP* o LSL), se encuentra insertado en el locus de expresión ubicua *Rosa26*. De esta manera, *lacZ* permanece silenciado hasta que un evento de recombinación mediado por Cre escinde la secuencia de terminación de la transcripción. A partir de ese momento se produce la expresión de β-galactosidasa bajo el control del promotor *Rosa26* (Figura 16) y dicha característica se hereda a todas las células que procedan de aquella en la que tiene lugar el evento de recombinación. Así pues, la administración de tamoxifeno a animales portadores de ambos alelos (*Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>) activa la recombinasa inducible CreERT2 en las células que expresan *Tie2* y ésta dirige la eliminación de la secuencia de parada de transcripción del locus *Rosa26* trazador con la consiguiente expresión de β-galactosidasa. Dicha enzima cataliza la reacción de hidrólisis de la lactosa en glucosa más galactosa y, a través del mismo mecanismo, la conversión del sustrato cromogénico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxi-indol; éste último forma dímeros de manera espontánea y es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un producto insoluble de intenso color azul. De esta manera, las células que expresan *Tie2* y por tanto CreERT2 son fácilmente detectables.



**Figura 16. Esquema de funcionamiento de la línea trazadora de la actividad de Cre *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>.** La expresión de *lacZ* únicamente es posible tras la escisión de la secuencia de parada de transcripción (*STOP*) mediante un evento de recombinación mediado por Cre. SA=sitio aceptor de *splicing*.

Adicionalmente a la tinción con X-gal, la presencia de la  $\beta$ -galactosidasa bacteriana también puede ser identificada mediante inmunodetección con anticuerpos específicos.

Para garantizar las condiciones óptimas en la inducción de recombinación y su consiguiente detección, la línea *Tie2*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> se estableció en homocigosis para ambos alelos sin que se detectara ningún efecto deletéreo en los animales. A continuación, ratones homocigotos (KI/KI) para los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> fueron sometidos a diversos protocolos de administración de tamoxifeno durante distintos momentos del desarrollo pre- y postnatal, y se evaluó el nivel de recombinación inducido por Cre mediante tinción con X-gal y/o análisis inmunohistoquímico. De esta manera, se caracterizó el patrón de expresión de CreERT2 y, al mismo tiempo, se definió la dosis de tamoxifeno y el protocolo de administración óptimos para inducir la máxima recombinación sin provocar alteraciones fisiológicas de importancia.

### 2.2.2 Inducción de la actividad de Cre durante el desarrollo embrionario

Como se ha descrito anteriormente (ver apartado 3.1 de Introducción), los procesos de neovascularización y remodelación vascular son especialmente activos durante el desarrollo embrionario, en particular durante la primera mitad de la gestación. De hecho, el desarrollo normal del embrión depende estrechamente de la correcta formación del sistema cardiovascular. Por ello resulta relevante establecer condiciones óptimas para la inducción de la actividad de Cre en el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> en diferentes estadios del desarrollo embrionario.

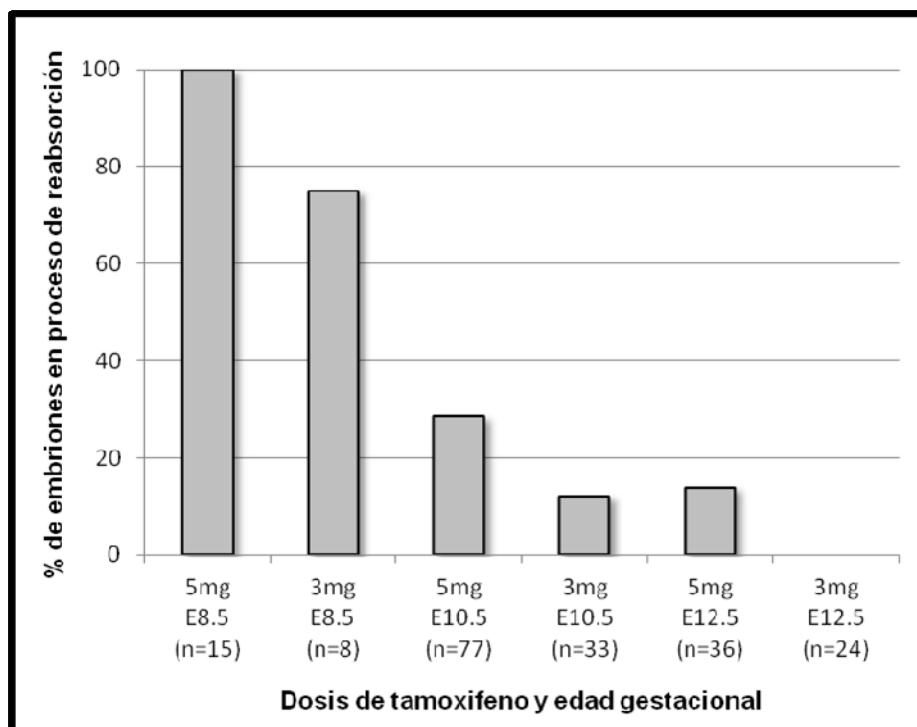
Para ello, se cruzaron entre sí ratones *knockin* homocigotos para ambos alelos, *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>, y se monitorizó la presencia del tapón vaginal, el cual es evidente durante las primeras 12 horas postcoito, y por tanto el día en que se observa se define como día 0.5 del desarrollo embrionario (E0.5). Las hembras gestantes fueron tratadas en diferentes momentos del desarrollo embrionario con distintas dosis de tamoxifeno por vía intraperitoneal (IP) y se evaluó la eficiencia de la recombinación inducida en los embriones en desarrollo así como el patrón de expresión de CreERT2.

#### 2.2.2.1 Evaluación de la tolerancia al tamoxifeno durante la gestación

La administración de tamoxifeno durante la gestación puede tener efectos negativos sobre los embriones en desarrollo y comprometer la viabilidad gestacional debido a sus efectos sobre los receptores de estrógenos (Furr and Jordan, 1984; Hayashi *et al.*, 2006). Por ello es importante establecer las dosis máximas toleradas que, sin comprometer la viabilidad de la gestación, induzcan la máxima recombinación posible.

Inicialmente, las hembras gestantes fueron tratadas con 3 ó 5 mg de tamoxifeno a E8.5, E10.5 y E12.5 y se evaluó, 48 horas después, la presencia de embriones en proceso de reabsorción. En sentido general, la frecuencia de aparición de eventos de reabsorción embrionaria es mayor en la medida que la

administración de tamoxifeno se realiza en dosis altas y a hembras en estadios de gestación más tempranos (Figura 17). De hecho, la obtención de embriones normales 48 horas después de la administración de tamoxifeno a E8.5 ocurre con muy baja frecuencia. A mayor edad gestacional la tolerancia al tratamiento con tamoxifeno aumenta. Así pues, a E10.5 es poco frecuente detectar eventos de reabsorción, particularmente con la menor dosis ensayada (3 mg). Finalmente, los tratamientos con 3 ó 5 mg de tamoxifeno a E12.5 son mayoritariamente tolerados por las hembras gestantes y es poco frecuente la aparición de embriones en proceso de reabsorción.



**Figura 17. Frecuencia de aparición de eventos de reabsorción embrionaria tras administración de tamoxifeno a hembras gestantes. Efecto de la administración de tamoxifeno sobre la viabilidad embrionaria. Valoración de la cantidad de embriones en proceso de reabsorción 48 horas después de la administración de distintas dosis de tamoxifeno a diferentes edades gestacionales. n = cantidad total de embriones identificados.**

Si bien se ha analizado el efecto a corto plazo de la administración de tamoxifeno sobre la viabilidad embrionaria, no se puede descartar que los efectos secundarios de éste agente tengan alguna consecuencia nociva en las crías, una vez llegada la gestación a término. De hecho, debido al efecto hormonal de dicho tratamiento es común la presencia de distocias durante el parto y es preferible la realización de cesáreas para la

recuperación de las crías. Al respecto, cabe mencionar que tras el análisis de 68 crías obtenidas por cesárea de 10 hembras sometidas a tratamiento con 5 mg de tamoxifeno a E10.5 ó E12.5, no se detectó la presencia de malformaciones de relevancia y la tasa de mortalidad perinatal fue menor del 10% (6 crías de 68).

En lo sucesivo, salvo que se indique lo contrario, la inducción de recombinación durante el desarrollo embrionario se realizó mediante administración de 3 mg de tamoxifeno a hembras gestantes a E10.5 ó 5 mg de tamoxifeno a E12.5.

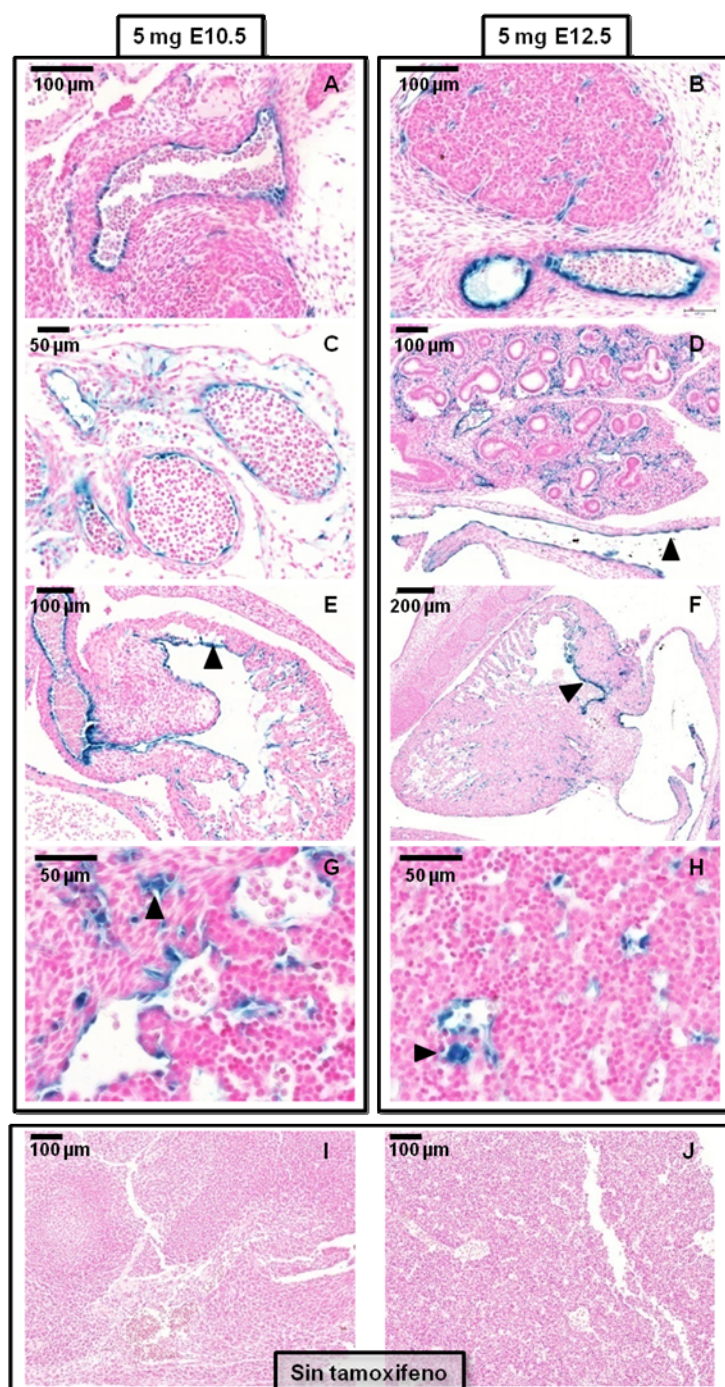
### 2.2.2.2 Análisis de la expresión de *Tie2* durante el desarrollo embrionario

Una vez establecidos los protocolos de dosificación que no comprometen severamente la viabilidad embrionaria durante el desarrollo gestacional, se procedió a evaluar la inducibilidad del modelo, la efectividad de la recombinación inducida y el patrón de expresión de la recombinasa CreERT2, y por tanto del gen *Tie2*, entre los días E10.5 y E12.5 del desarrollo. Para ello, 48 horas después de la inducción de recombinación las hembras fueron sacrificadas y los embriones sometidos a tinción X-gal en preparación completa (ver apartado 2.2.1 de los Materiales y Métodos). Todas las dosis de tamoxifeno ensayadas en los estadios gestacionales seleccionados inducen una recombinación muy eficiente y fácilmente detectable por la presencia de coloración azul específicamente en estructuras vasculares; al mismo tiempo, se demuestra que en ausencia de tamoxifeno no existe actividad de la recombinasa inducible y por tanto no es detectable la expresión de  $\beta$ -galactosidasa (Figura 18).

Figura 18. Tinción X-gal en preparación completa de embriones homocigotos para *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>. Hembras gestantes a E8.5, E10.5 ó E12.5 fueron tratadas con 3 ó 5 mg de tamoxifeno IP; 48 horas después los embriones fueron extraídos y tefidos con X-gal. Las cabezas de flecha negra señalan estructuras vasculares positivas para  $\beta$ -Gal. En el panel inferior se muestran embriones tefidos para X-gal cuyas madres no recibieron tratamiento con tamoxifeno.

Si bien la técnica de tinción X-gal en preparación completa permite un análisis global de la





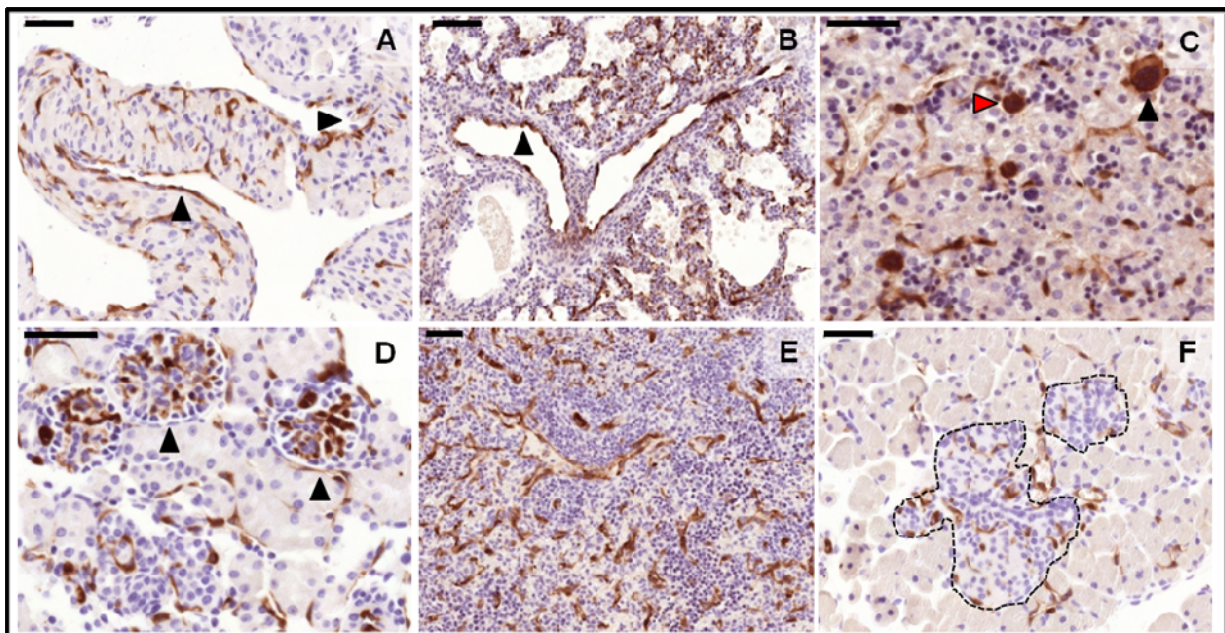
**Figura 19. Secciones de parafina de embriones teñidos con X-gal en preparación completa. A y B. Endotelio vascular sanguíneo en región intervertebral. C. Vasculatura del cordón umbilical. D. Pulmón y región torácica; la cabeza de flecha señala el endotelio de la aorta dorsal. E y F. Corazón; las cabezas de flecha señalan el endocardio. G y H. Hígado; las cabezas de flecha señalan nido eritroide (en G) y megacariocito (en H). I y J. Secciones de embriones que no recibieron tamoxifeno.**

administración de 5 mg de tamoxifeno a E10.5 en crías obtenidas mediante cesárea una vez llegada la gestación a término (E19.5). En este caso, la estrategia de análisis se basó en la inmunodetección de  $\beta$ -galactosidasa (ver apartado 2.2.3 de Materiales y Métodos), ya que la tinción X-gal en preparación

eficiencia de recombinación, su poder de resolución es limitado. Por ello, una vez realizada la tinción se procedió al análisis histológico de algunas muestras representativas mediante la inclusión de los embriones en bloques de parafina y la preparación de secciones histológicas contrateñidas con el marcador NFR. Este análisis (Figura 19) permite confirmar que la recombinación inducida con el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> es altamente específica para el endotelio vascular sanguíneo en todos los órganos analizados incluyendo el revestimiento endotelial interno del endocardio, lo cual coincide con el patrón de expresión descrito para *Tie2* (Dumont *et al.*, 1994). Adicionalmente, se detecta tinción positiva en algunas poblaciones de nidos eritroides y megacariocitos del hígado fetal, en coincidencia con lo reportado en la literatura (Hsu *et al.*, 2000), y en estructuras extraembrionarias como la vasculatura del cordón umbilical. Cabe destacar que no se detectan diferencias significativas en el patrón de recombinación en función de la edad gestacional a la que se administra el tamoxifeno y que el sistema goza de un estricto control temporal, dado que, en ausencia de dicho fármaco no se observa ninguna evidencia de recombinación mediada por Cre.

A continuación se analizó el patrón de recombinación inducido por la

completa sobre órganos enteros presenta limitaciones en la penetración del sustrato y, adicionalmente, la pigmentación azul tiende a perderse durante el proceso de preparación de los bloques de parafina. Los resultados obtenidos (Figura 20) evidencian que la inmunodetección de  $\beta$ -galactosidasa recapitula fielmente el patrón de recombinación detectado mediante tinción X-gal. Así pues, la recombinación mediada por Cre se limita fundamentalmente al endotelio vascular sanguíneo y al manto endotelial del endocardio. Cabe destacar que en las muestras de órganos de crías recién nacidas se observa una mayor densidad de estructuras positivas para  $\beta$ -galactosidasa en comparación con el análisis de embriones en gestación. Esto puede deberse al mayor grado de desarrollo de las estructuras vasculares toda vez que la recombinación es una alteración genómica permanente que se hereda a todas las células descendientes. Igualmente, la mayor efectividad de la inmunodetección respecto a la tinción X-gal puede contribuir a dicha diferencia.

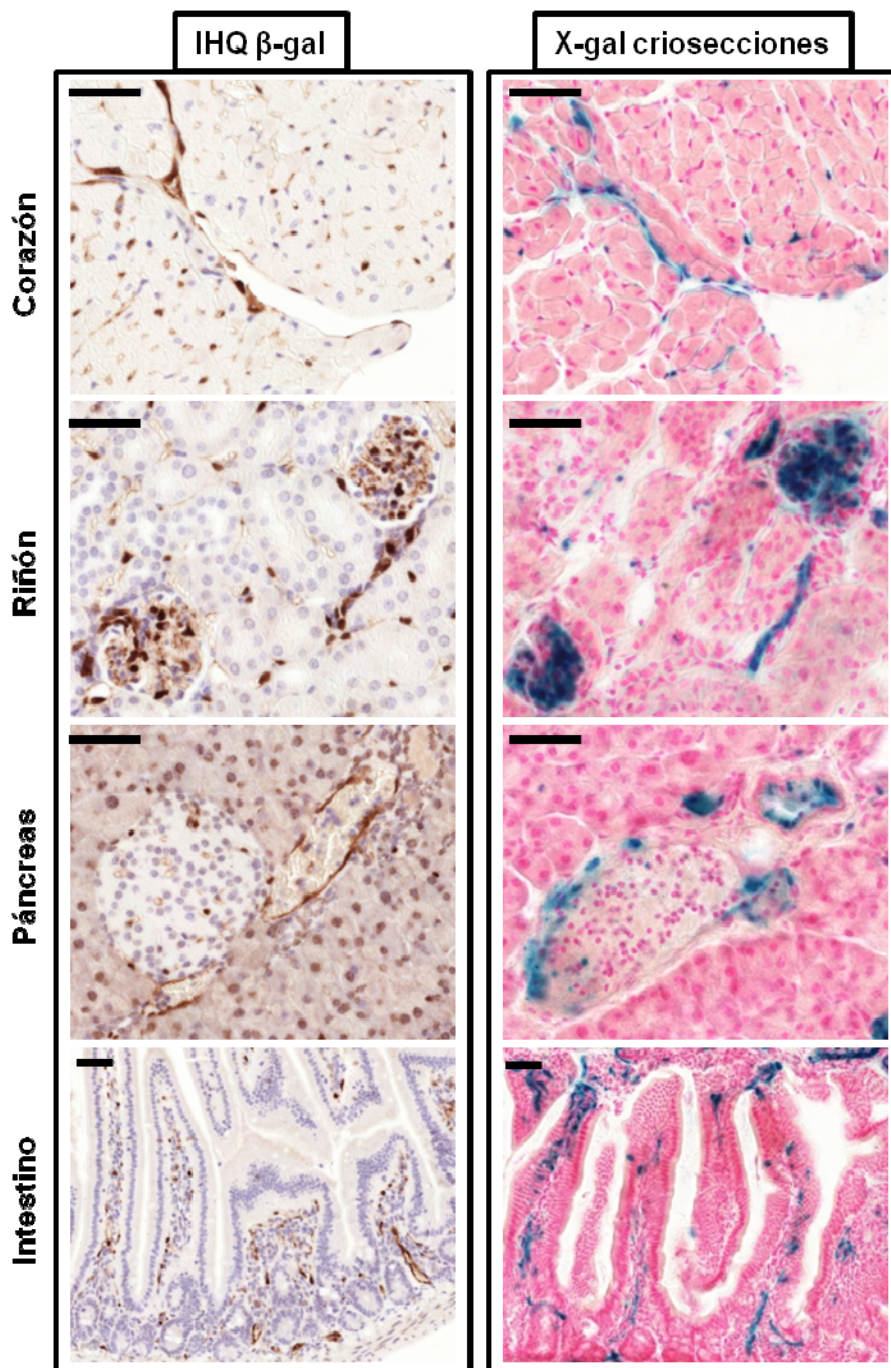


**Figura 20. Inmunohistoquímica para  $\beta$ -galactosidasa en órganos de crías obtenidas por cesárea a E19.5.** Los animales fueron tratados con 5 mg de tamoxifeno durante el desarrollo embrionario (E10.5). **A.** Corazón; las cabezas de flecha señalan el endocardio. **B.** Pulmón; la cabeza de flecha señala el endotelio vascular. **C.** Hígado; detección de recombinación en megacariocitos (cabeza de flecha negra) y precursores hematopoyéticos (cabeza de flecha roja). **D.** Riñón; las cabezas de flecha señalan los glomérulos renales; adicionalmente se observa recombinación en capilares intertubulares. **E.** Bazo. **F.** Páncreas; se detecta recombinación en estructuras vasculares del páncreas incluidos los islotes pancreáticos (delimitados por línea punteada). Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m. Todas las crías analizadas son homocigotas para los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>* y *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>*.

La inducción de recombinación en las células que expresan Tie2 durante el desarrollo embrionario, permite realizar un análisis de trazado de linajes e identificar el destino final que tienen dichas células en el adulto. Tie2 se expresa activamente durante los días E10.5 y E12.5 de la gestación y contribuye a la formación de la red vascular. De hecho, ratones *knockout* de Tie2 presentan letalidad embrionaria alrededor del día E10.5 debido a trastornos en el endocardio, presencia de hemorragias y defectos en el desarrollo de la red vascular (Dumont *et al.*, 1994). Con objeto de analizar el destino final de las células que expresan Tie2 durante este periodo, hembras gestantes fueron tratadas con 5 mg de tamoxifeno a



E10.5 ó E12.5 y sometidas a cesárea a E19.5. A continuación, las crías, todas ellas homocigotas para los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>, fueron puestas en adopción con una hembra nodriza hasta su destete. Una vez alcanzada la edad adulta (10-12 semanas de edad) se sacrificaron y se tomaron muestras de distintos órganos para analizar el patrón de expresión de  $\beta$ -galactosidasa mediante inmunohistoquímica y tinción X-gal en criosecciones (ver apartado 2.2.2 de Materiales y Métodos). Todas las estructuras tisulares positivas para este marcador serán inequívocamente descendientes de las células que expresan *Tie2*, y por tanto CreERT2, en los días E10.5 ó E12.5 del desarrollo embrionario. Los resultados obtenidos (Figura 21) ponen de manifiesto que las células Tie2-positivas presentes en el embrión en desarrollo dan origen mayoritariamente al endotelio vascular sanguíneo sin que se detecte su contribución al desarrollo del endotelio de los vasos linfáticos (ver apartado 2.2.5 de Resultados) o a estructuras extra-vasculares. Mención especial merece la participación de las células que expresan *Tie2* durante el desarrollo embrionario en la hematopoyesis, aspecto que será tratado en detalle más adelante (ver apartado 2.2.6 de Resultados).

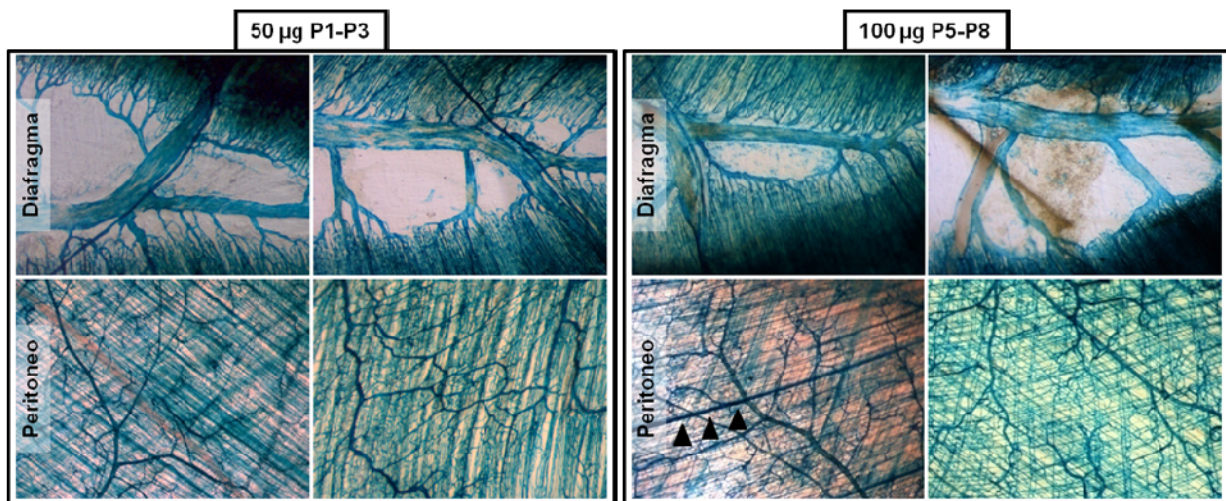


**Figura 21. Inmunohistoquímica (IHQ) para  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) y tinción X-gal de criosecciones de órganos de ratones adultos.** Los animales fueron tratados con 5 mg de tamoxifeno durante el desarrollo gestacional (E10.5). Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m. Todos los animales analizados son homocigotos para los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>.

### 2.2.3 Inducción de la actividad de Cre durante el desarrollo perinatal

Una vez demostrada la efectividad del modelo en la inducción de recombinación específicamente en el endotelio vascular durante el desarrollo embrionario, se procedió a evaluar su eficacia durante la primera semana de desarrollo postnatal. Durante dicho periodo se produce un importante incremento de talla y peso, con la consiguiente demanda de vascularización para los tejidos en crecimiento. Adicionalmente, algunas redes de vasos sanguíneos, como la vasculatura de la retina, se desarrollan específicamente durante esta etapa y constituye un modelo experimental ampliamente utilizado en el estudio de la angiogénesis (Stahl *et al.*, 2010).

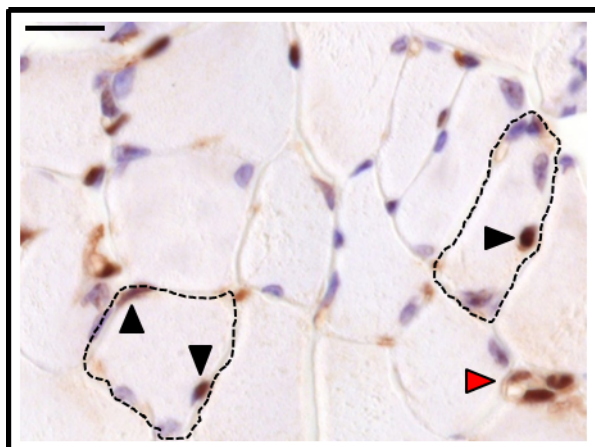
Para inducir la actividad de Cre durante el desarrollo perinatal se utilizaron dos protocolos diferentes de administración de tamoxifeno. En un caso, se trataron crías homocigotas para los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>* y *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>* con 50 µg de tamoxifeno por vía intragástrica (ver apartado 2.1.3 de Materiales y Métodos) durante los 3 primeros días de vida (P1 a P3, tomando el día de nacimiento como P0); alternativamente las crías se trataron con 100 µg de tamoxifeno por vía IP durante 4 días consecutivos (P5 a P8). Ninguno de estos protocolos de administración provocó letalidad en las crías o deficiencias significativas en su crecimiento o ganancia de peso. El análisis de la recombinación inducida se realizó mediante tinción X-gal en preparaciones completas de peritoneo y diafragma, tinción X-gal de criosecciones e inmunodetección de β-galactosidasa en muestras de órganos de animales adultos.



**Figura 22. Tinción X-gal en preparación completa de diafragma y peritoneo de animales tratados durante el desarrollo perinatal. Ambos tratamientos ensayados (50 µg de P1 a P3 ó 100 µg de P5 a P8) inducen una eficiente recombinación en las redes vasculares sanguíneas. Las cabezas de flecha señalan una fibra muscular del peritoneo positiva para lacZ. Todos los animales analizados son homocigotos para los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>* y *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>*.**

La tinción X-gal en preparaciones completas de peritoneo y diafragma permite conservar la integridad de las redes vasculares y observar su disposición anatómica en estos tejidos, los cuales, dado su escaso grosor, permiten una correcta penetración del sustrato cromogénico. Mediante esta técnica de tinción se pudo comprobar que ambos protocolos de administración de tamoxifeno inducen recombinación en la mayor parte de la vasculatura sanguínea sin que se aprecien diferencias significativas en la efectividad de los mismos (Figura 22). La especificidad del modelo por el endotelio

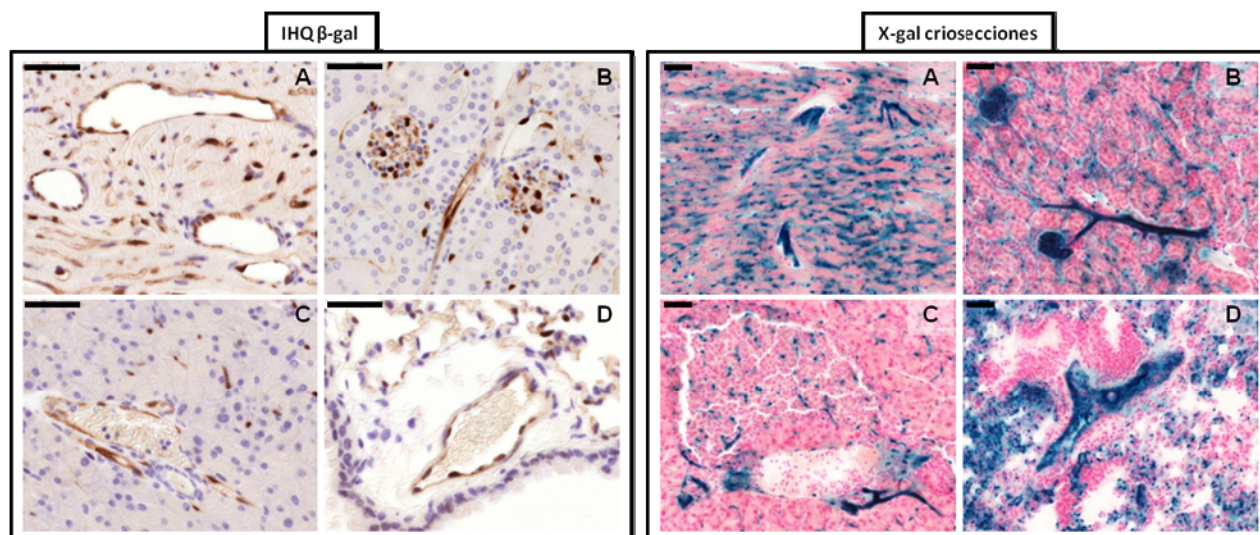




**Figura 23. Imunohistoquímica para  $\beta$ -galactosidasa en músculo esquelético de ratones tratados durante el desarrollo perinatal.** Los animales fueron tratados con 50  $\mu$ g de P1 a P3. Corte transversal de fibras musculares (delimitadas por línea punteada) con miocitos positivos para  $\beta$ -galactosidasa (cabezas de flecha negras); la cabeza de flecha roja señala un capilar sanguíneo.

vascular se mantiene aunque en el peritoneo se detectan algunos haces musculares positivos para  $\beta$ -galactosidasa. Mediante análisis histológico e inmunodetección de dicho marcador (Figura 23), se confirma su presencia en miocitos de algunas fibras de músculo esquelético.

Por su parte, el análisis histológico mediante tinción X-gal de criosecciones e inmunodetección de  $\beta$ -galactosidasa (Figura 24) confirma que la expresión de CreERT2 es mayoritariamente específica del endotelio vascular y pone de manifiesto la eficiencia de la recombinación inducida en todos los órganos analizados. Así pues, la mayor parte de la vasculatura sanguínea, incluyendo capilares, vénulas, arteriolas e incluso vasos de mayor calibre, así como el endocardio, son positivos para  $\beta$ -galactosidasa. Al igual que se ha mencionado con anterioridad, es posible detectar recombinación en algunos megacariocitos y precursores eritroides o mieloides. Finalmente, es importante destacar que el sistema goza de un estricto control temporal también en estas condiciones dado que, en ausencia de tamoxifeno, es imposible detectar eventos de recombinación mediados por Cre.

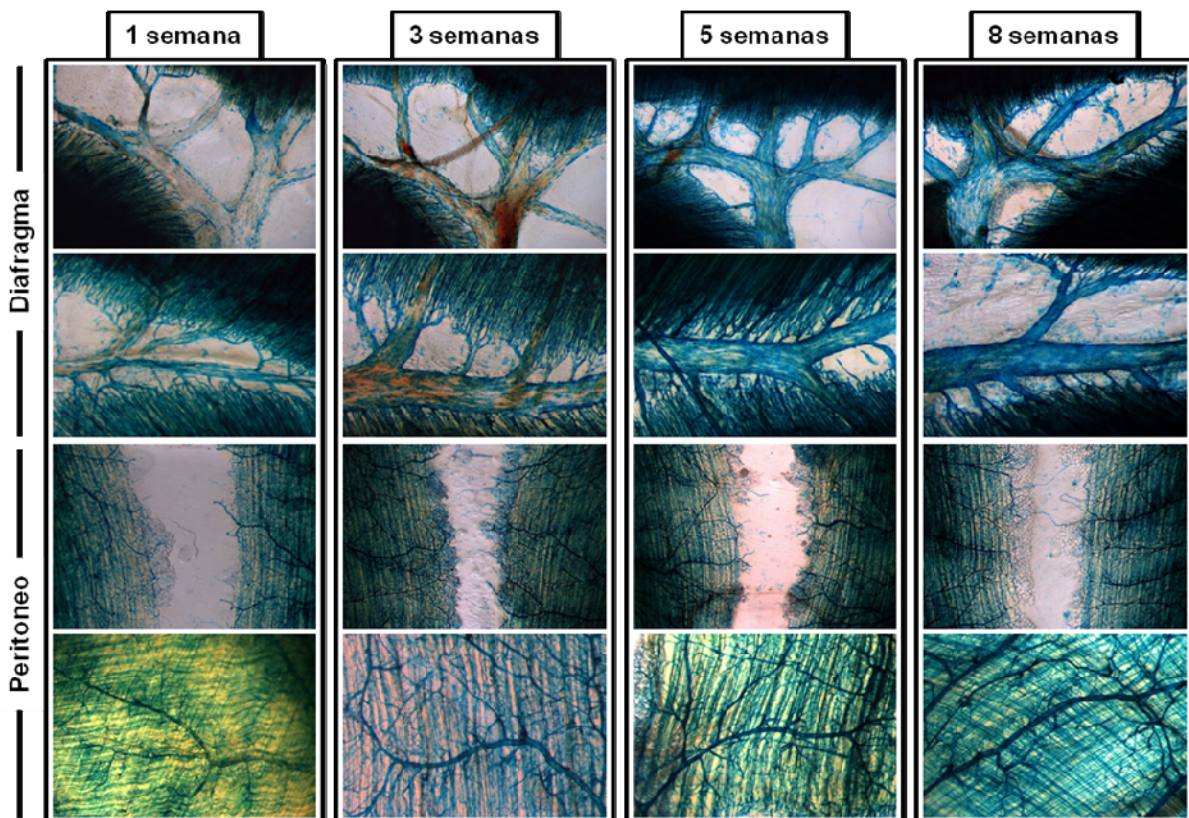


**Figura 24. Imunohistoquímica (IHQ) para  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) y tinción X-gal de criosecciones de órganos de ratones adultos.** Los animales fueron tratados con 50  $\mu$ g de tamoxifeno durante el desarrollo perinatal (P1-P3). A Corazón. B. Riñón. C. Páncreas. D. Pulmón. Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m. Todos los animales analizados son homocigotos para los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>* y *Rosa26<sup>LSlacZ</sup>*.

### 2.2.4 Inducción de la actividad de Cre en el animal adulto

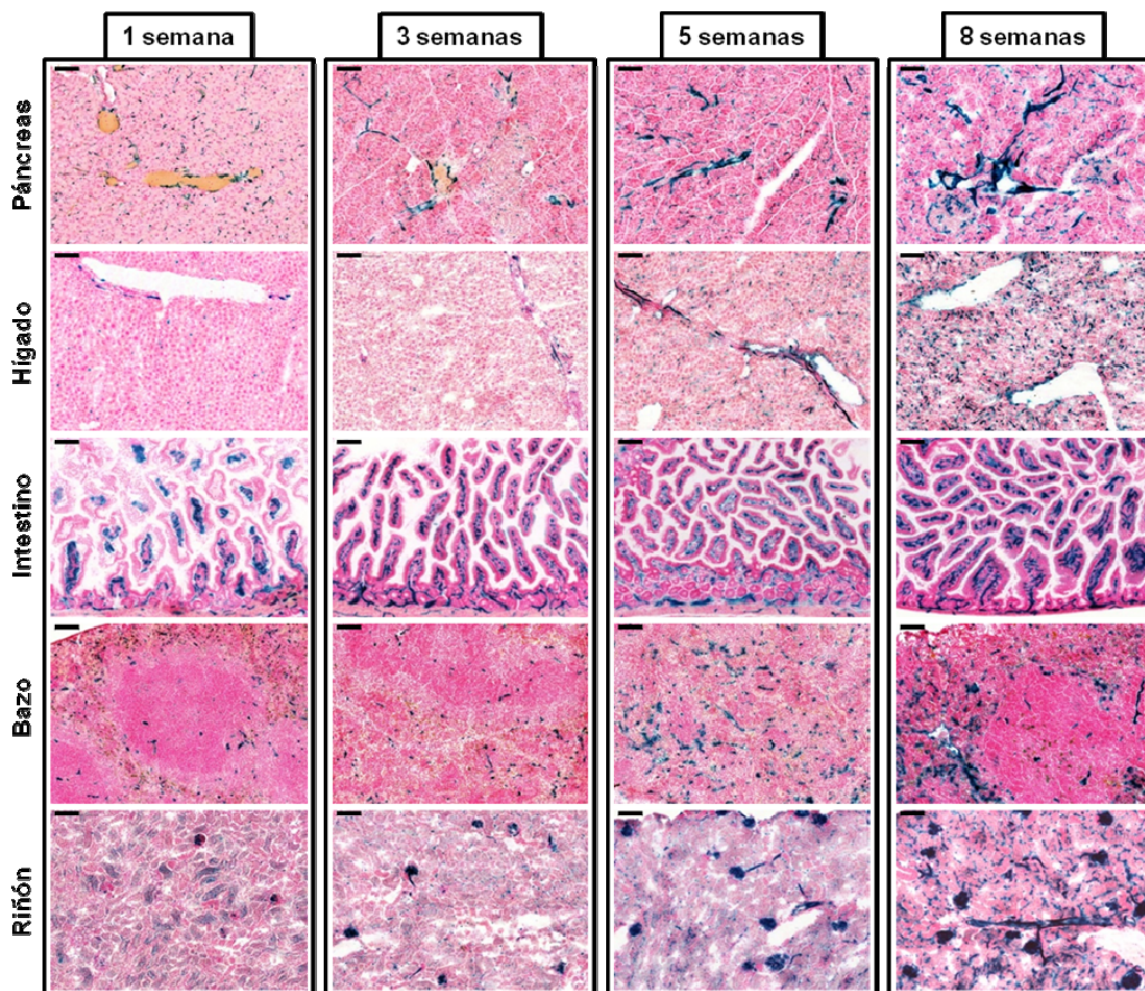
Para completar la caracterización de la inducibilidad del modelo, se analizó la eficiencia y la especificidad tisular de la recombinación en animales jóvenes (a partir de cuatro semanas) y adultos (a partir de siete semanas), homocigotos para los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>, mediante administración de distintas dosis de tamoxifeno por vía oral o IP. En ambos casos se dispuso de grupos control con el mismo genotipo, a los cuales no se administró tamoxifeno y en los que no se detectó ningún evento de recombinación, evidenciando el estricto control temporal del sistema también en el animal adulto.

La administración por vía oral se realizó mediante una dieta comercial cuya formulación incluye 0,4 mg de tamoxifeno por cada gramo de pienso y de la cual los animales disponen *ad libitum* a partir del décimo día postdestete (aproximadamente a las cuatro semanas de edad) y durante un período de tiempo variable: 1, 3, 5 u 8 semanas consecutivas (ver apartado 2.1.1 de Materiales y Métodos). A las 15 semanas de edad se analizó la recombinación inducida mediante tinción X-gal en preparación completa de diafragma y peritoneo (Figura 25). Como puede observarse, existe una evidente relación dosis-respuesta en la inducción de la recombinación, de forma tal que la vasculatura sanguínea muestra una coloración azul más homogénea e intensa a medida que se prolonga la administración de tamoxifeno.



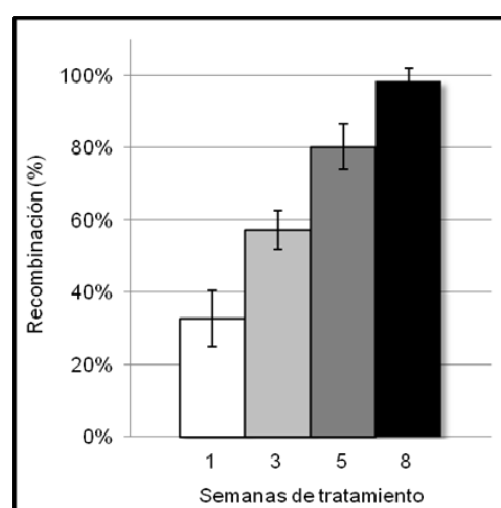
**Figura 25. Tinción X-gal en preparación completa de diafragma y peritoneo de animales tratados con tamoxifeno en la dieta. Recombinación inducida tras la administración de dieta tamoxifeno a animales adultos. Todos los animales analizados son homocigotos para los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>.**





**Figura 26. Tinción X-gal en criosecciones de órganos de animales tratados con tamoxifeno en la dieta. Recombinación inducida tras la administración de tamoxifeno en la dieta a animales adultos. Las barras de escala equivalen a 100 µm. Todos los animales analizados son homocigotos para los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>* y *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>*.**

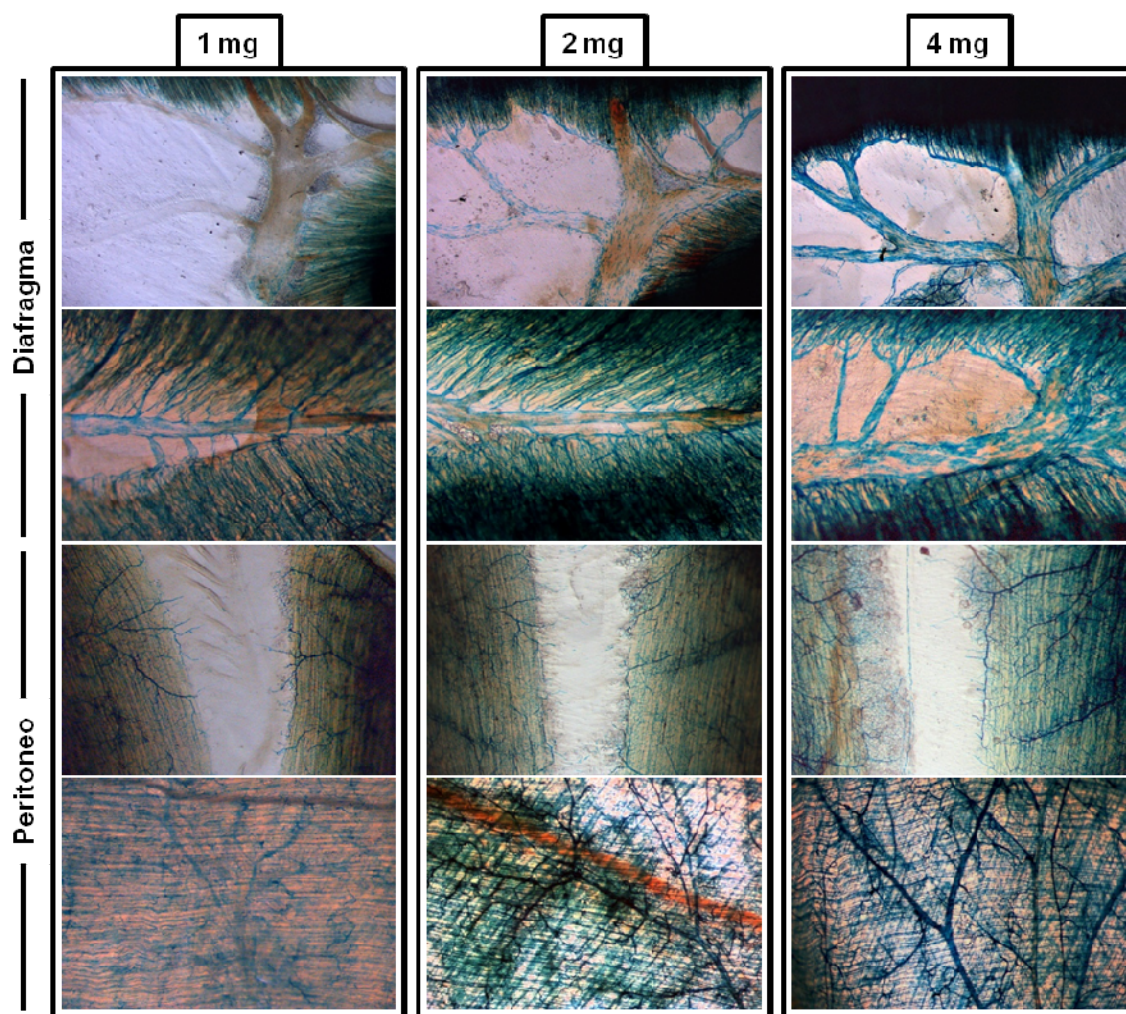
Si bien mediante esta técnica no se detecta una diferencia considerable entre los tratamientos de cinco y ocho semanas, un análisis más detallado mediante tinción X-gal en criosecciones (Figura 26) y análisis cuantitativo de las mismas (Figura 27), revela que la recombinación es mayor en aquellos animales que reciben tamoxifeno durante el tiempo máximo. Por su parte, tratamientos superiores a ocho semanas no han demostrado incrementar la efectividad de la recombinación, al tiempo que encarecen y alargan el procedimiento. Ninguno de los protocolos ensayados generó síntomas clínicos y en general la dieta es bien aceptada por los animales, que muestran ganancias de peso similares a aquellos alimentados con dieta habitual.



**Figura 27. Eficiencia de recombinación inducida tras administración de tamoxifeno en la dieta. Porcentaje de recombinación inducido ( $\pm$ SEM) tras la administración de tamoxifeno en la dieta.**



Al mismo tiempo, se ensayó la administración de tamoxifeno por vía IP (ver apartado 2.1.2 de Materiales y Métodos) a grupos de animales de siete semanas de edad, momento en el que alcanzan la madurez sexual y a partir del cual no existen variaciones importantes en el peso. En función de los datos reportados previamente en la literatura y en ensayos de toxicidad (Furr and Jordan, 1984), se definieron tres protocolos distintos que consistieron en la administración de 1, 2 ó 4 mg diarios de tamoxifeno durante cinco días consecutivos en una dosis única por día. Los resultados obtenidos (Figuras 28 y 29) evidencian que si bien la relación dosis-respuesta se mantiene, la recombinación inducida mediante la administración IP es menos eficiente que la alcanzada administrando pienso con tamoxifeno. Así pues, el mayor nivel de recombinación inducido con el tratamiento IP alcanza un 70% de eficiencia (Figura 30), mientras que el tratamiento con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas induce recombinación superior al 95%. Adicionalmente, se ha detectado mayor variabilidad en la inducción de recombinación tras la administración IP, probablemente debido a variaciones en la absorción del fármaco. Finalmente, cabe mencionar que la dosis máxima por vía IP (4 mg) genera cierto grado de toxicidad en algunos animales que se manifiesta en pérdida de peso, piloerección y cifosis dorsal. Estos mismos síntomas se

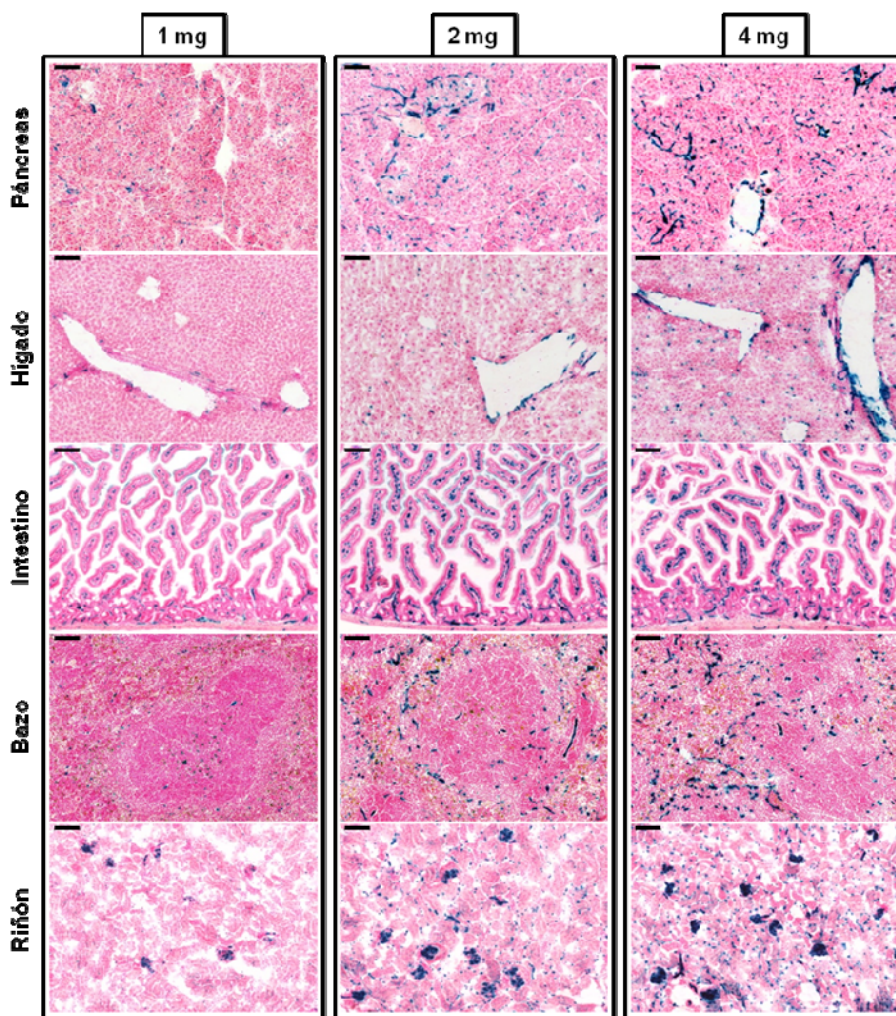


**Figura 28. Tinción X-gal en preparación completa de diafragma y peritoneo de animales tratados con tamoxifeno por vía IP. Recombinación inducida tras la administración de distintas dosis de tamoxifeno (1, 2 ó 4 mg) durante cinco días consecutivos. Todos los animales analizados son homocigotos para los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>* y *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>*.**

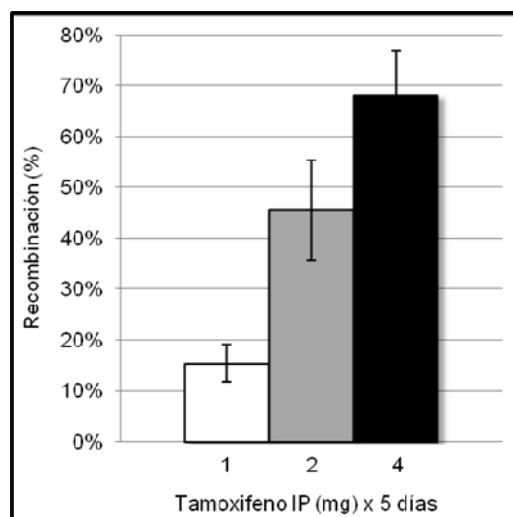
apreciaron en ratones silvestres sometidos a dicho tratamiento por lo que se descarta que pueda deberse a la activación de la recombinasa Cre o a la expresión de  $\beta$ -galactosidasa.

Una vez identificado el protocolo que induce el mayor grado de recombinación en el endotelio vascular (ocho semanas de dieta tamoxifeno), se procedió a analizar en detalle el patrón de expresión de CreERT2 mediante inmunohistoquímica para  $\beta$ -galactosidasa (Figura 31). El análisis histológico revela que los eventos de

recombinación ocurren mayoritariamente en el endotelio vascular sanguíneo, con especial preferencia por la microvasculatura incluyendo capilares, vénulas y arteriolas. También se detecta recombinación en vasos de mayor calibre aunque, en ocasiones, con cierto grado de mosaicismo. Adicionalmente, mediante tinción X-gal en preparación completa de diafragma es posible visualizar expresión puntual de  $\beta$ -galactosidasa en algunos vasos linfáticos (Figura 32), con escasa penetrancia y uniformidad. Dicha situación se limita a pocos vasos del diafragma y peritoneo de animales tratados con cinco u ocho semanas de tamoxifeno en la dieta sin que sea detectable en ratones inducidos con protocolos de inducción de menor duración. Adicionalmente, no ha sido posible la

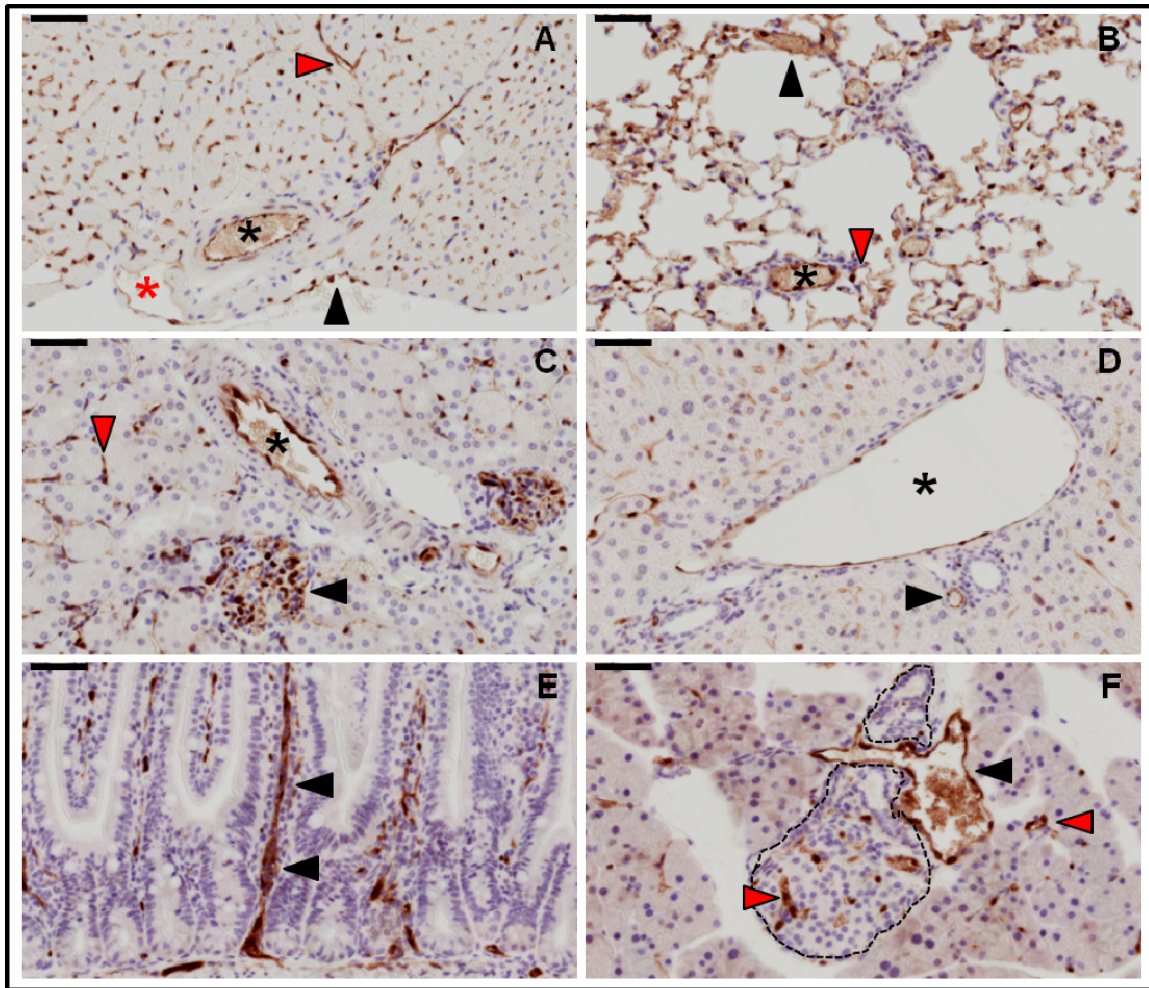


**Figura 29. Tinción X-gal en criosecciones de órganos de animales tratados con tamoxifeno por vía IP. Recombinación inducida tras la administración de distintas dosis de tamoxifeno (1, 2 ó 4 mg) durante cinco días consecutivos. Las barras de escala equivalen a 100  $\mu$ m. Todos los animales analizados son homocigotos para los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>* y *Rosa26<sup>LSlacZ</sup>*.**

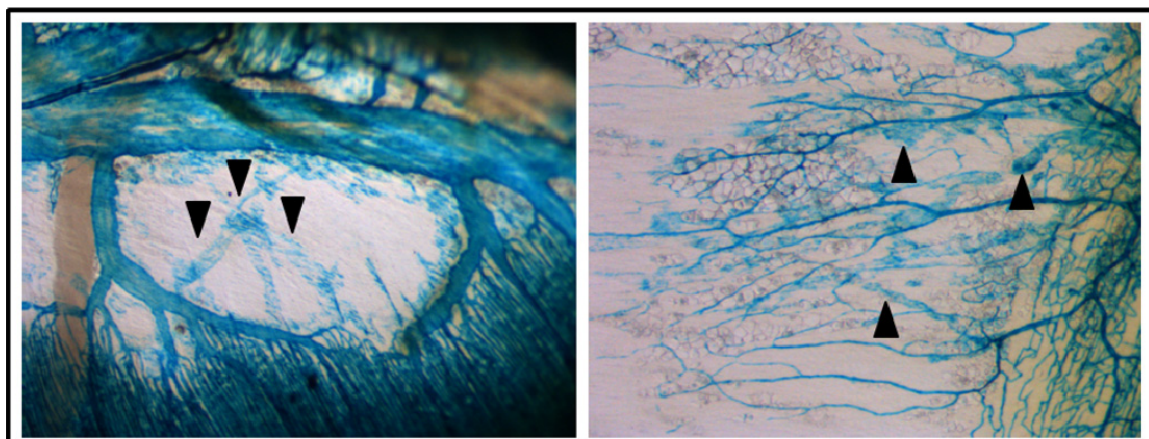


**Figura 30. Eficiencia de recombinación inducida tras administración IP de tamoxifeno. Porcentaje de recombinación inducido ( $\pm$ SEM) tras inyección IP de tamoxifeno durante cinco días consecutivos.**





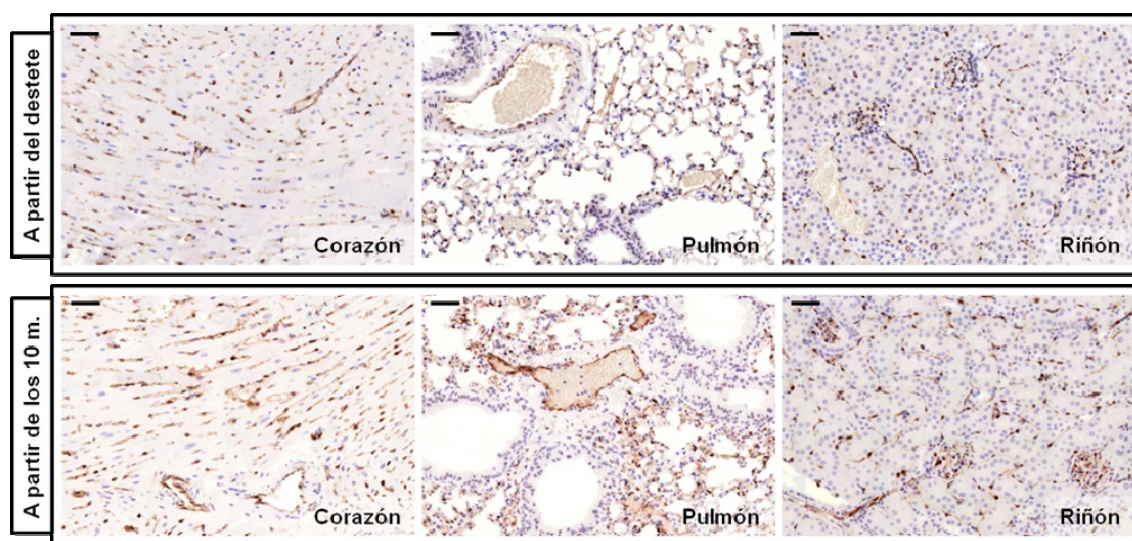
**Figura 31.** Inmunohistoquímica para  $\beta$ -galactosidasa en órganos de animales tratados con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas. A. Corazón: se señala el endotelio vascular (cabeza de flecha negra), arteriola (asterisco negro), vénula (asterisco rojo) y capilares (cabeza de flecha roja). B. Pulmón: se indica arteriola (asterisco negro), vénula (cabeza de flecha negra) y capilares interalveolares (cabeza de flecha roja). C. Riñón: se señala arteriola (asterisco negro), glomérulo renal (cabeza de flecha negra) y capilares intertubulares (cabeza de flecha roja). D. Hígado: vena central (asterisco negro) y arteriola (cabeza de flecha negra) de la triada hepática. E. Intestino: se indica el vaso sanguíneo de la cripta intestinal (cabezas de flecha negra). F. Páncreas: se señala vénula (cabeza de flecha negra) y capilares (cabeza de flecha roja) en el páncreas endocrino (delimitado por línea punteada) y exocrino. Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m.



**Figura 32.** Tinción X-gal en preparación completa de diafragma (izquierda) y peritoneo (derecha) de animales tratados con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas. Identificación de recombinación en el endotelio vascular de algunos vasos linfáticos (señalados con cabezas de flecha negras).

identificación de vasos linfáticos recombinados en preparaciones histológicas mediante inmunodetección de  $\beta$ -galactosidasa (ver apartado 2.2.5 de Resultados), lo cual sugiere que la eficiencia de recombinación en el endotelio vascular linfático es sumamente baja.

Bajo condiciones fisiológicas normales, más del 99% de las células endoteliales se encuentran en estado de quiescencia (Augustin *et al.*, 1994) y en ellas *Tie2* se expresa de forma constitutiva a bajos niveles (Jones *et al.*, 2001). Dado que todos los protocolos de inducción ensayados mediante administración de tamoxifeno en la dieta se inician diez días después del destete (aproximadamente a las cuatro semanas de edad), momento en el cual el ratón aún se encuentra en fase de crecimiento, resulta interesante analizar si la recombinación inducida es igualmente eficiente en animales que son tratados exclusivamente en la edad adulta. Para ello se procedió a administrar dieta con tamoxifeno durante tres semanas consecutivas a ratones de 10 meses de edad y a analizar la recombinación inducida, mediante inmunodetección de  $\beta$ -galactosidasa, una semana después de la conclusión del tratamiento (Figura 33). Los resultados obtenidos indican que la eficiencia de recombinación no varía sensiblemente respecto a aquella alcanzada en animales tratados a partir del destete, por lo que puede concluirse que el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> es capaz de inducir eficientemente la recombinación en el endotelio vascular de los animales adultos.



**Figura 33. Inmunohistoquímica para  $\beta$ -galactosidasa en órganos de animales tratados con tamoxifeno en la dieta durante tres semanas. Comparación de la recombinación inducida en animales tratados diez días después del destete o una vez cumplidos 10 meses de edad. Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m. Todos los animales analizados son homocigotos para *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>.**

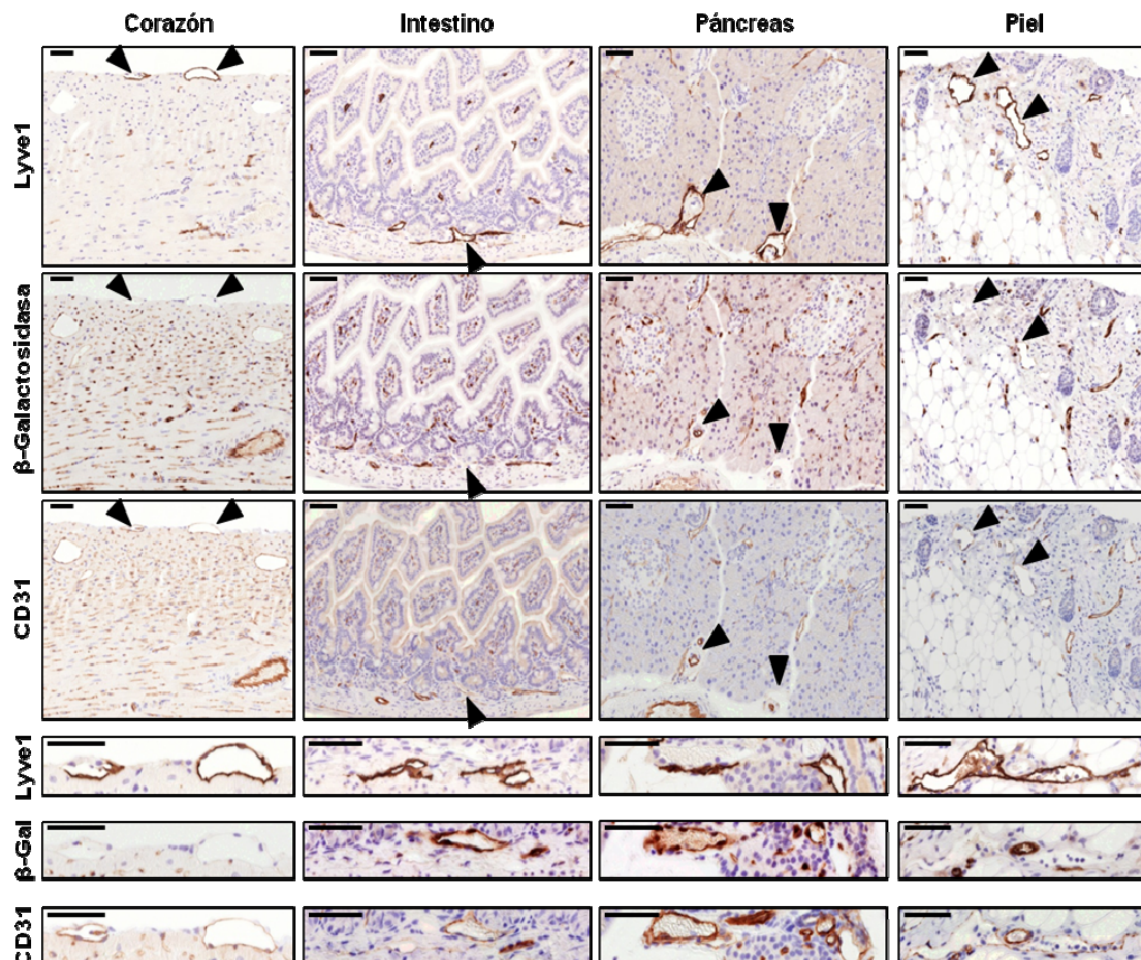
## 2.2.5 Análisis de la especificidad por el endotelio vascular sanguíneo

Uno de los elementos más relevantes en la caracterización del modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> es el análisis de la especificidad de la recombinación en el endotelio vascular sanguíneo y/o linfático. *Tie2* es considerado un marcador del endotelio vascular en general y existen evidencias de su expresión en el endotelio de los vasos linfáticos (Morisada *et al.*, 2005; Tammela *et al.*, 2005). De hecho, ratones *knockout* para angiopoietina 2 (uno de los ligandos específicos de *Tie2*) evidencian defectos en la remodelación y



maduración de los vasos linfáticos (Gale *et al.*, 2002). Con el objetivo de confirmar si la recombinación inducida por el modelo  $Tie2^{CreERT2}$  es específica para el endotelio vascular sanguíneo, se procedió a analizar la co-expresión de  $\beta$ -galactosidasa y marcadores que permiten la identificación de los vasos sanguíneos (CD31) o linfáticos (Lyve1) mediante inmunohistoquímica en secciones consecutivas de órganos de ratones homocigotos para  $Tie2^{CreERT2}$  y  $Rosa26^{LSLlacZ}$ .

Inicialmente se analizó la especificidad del patrón de recombinación endotelial inducido en ratones adultos tratados con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas a partir del destete. La inmunodetección en secciones histológicas con los marcadores antes mencionados permite discriminar con relativa facilidad los vasos sanguíneos de los linfáticos: si bien CD31 es considerado un marcador panendotelial, su expresión es considerablemente menor en los vasos linfáticos respecto a los sanguíneos (Sleeman *et al.*, 2001), así pues, todos aquellos vasos fuertemente positivos para CD31 y negativos para Lyve-1 son identificados como sanguíneos, mientras que los débilmente positivos (o negativos) para CD31 y positivos para Lyve-1 serán linfáticos. Los resultados obtenidos (Figura 34) permiten concluir que la gran mayoría de las estructuras vasculares positivas para CD31 expresan altos

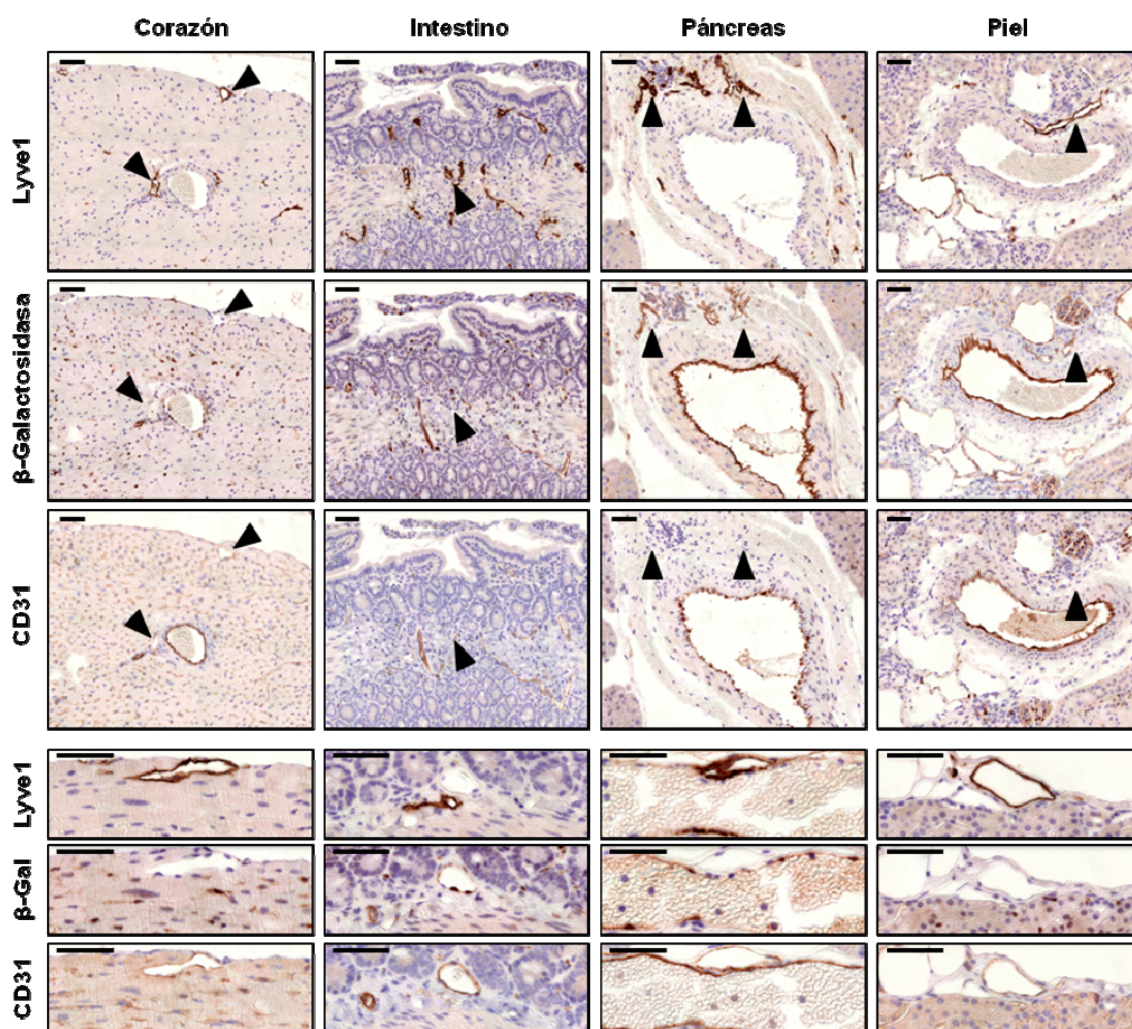


**Figura 34.** Inmunohistoquímica para  $\beta$ -galactosidasa, Lyve-1 y CD31 en órganos de animales tratados con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas. Las cabezas de flecha negra señalan vasos linfáticos positivos para Lyve-1. Nótese que dichos vasos son débilmente positivos para CD31 y negativos para  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) en todos los tejidos analizados. En los recuadros inferiores se aprecia con más detalle la ausencia de expresión de  $\beta$ -galactosidasa en los vasos positivos para Lyve-1. Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m. Animales homocigotos para  $Tie2^{CreERT2}$  y  $Rosa26^{LSLlacZ}$ .



niveles de  $\beta$ -galactosidasa y son negativas para Lyve-1. Al mismo tiempo, es prácticamente imposible detectar estructuras vasculares positivas para Lyve-1 que co-expresen el marcador  $\beta$ -galactosidasa. Dichos resultados, además de confirmar el alto grado de recombinación inducido, evidencian que la expresión de CreERT2 se restringe mayoritariamente al endotelio vascular sanguíneo.

De la misma manera, el análisis de la expresión de  $\beta$ -galactosidasa y los marcadores CD31 y Lyve-1 en secciones histológicas de órganos de animales adultos tratados con tamoxifeno durante el desarrollo gestacional (5 mg a E10.5), evidencia que la expresión de  $\beta$ -galactosidasa se restringe mayoritariamente al endotelio vascular sanguíneo con escasa o nula expresión de dicho marcador en las células endoteliales de los vasos linfáticos (Figura 35). Estos resultados sugieren que, al menos durante esta etapa del desarrollo embrionario, la expresión de Tie2, y por tanto de CreERT2, es principalmente exclusiva del endotelio vascular sanguíneo, o bien que los niveles de expresión de dicho receptor en el endotelio vascular linfático son demasiado bajos como para inducir recombinación detectable.



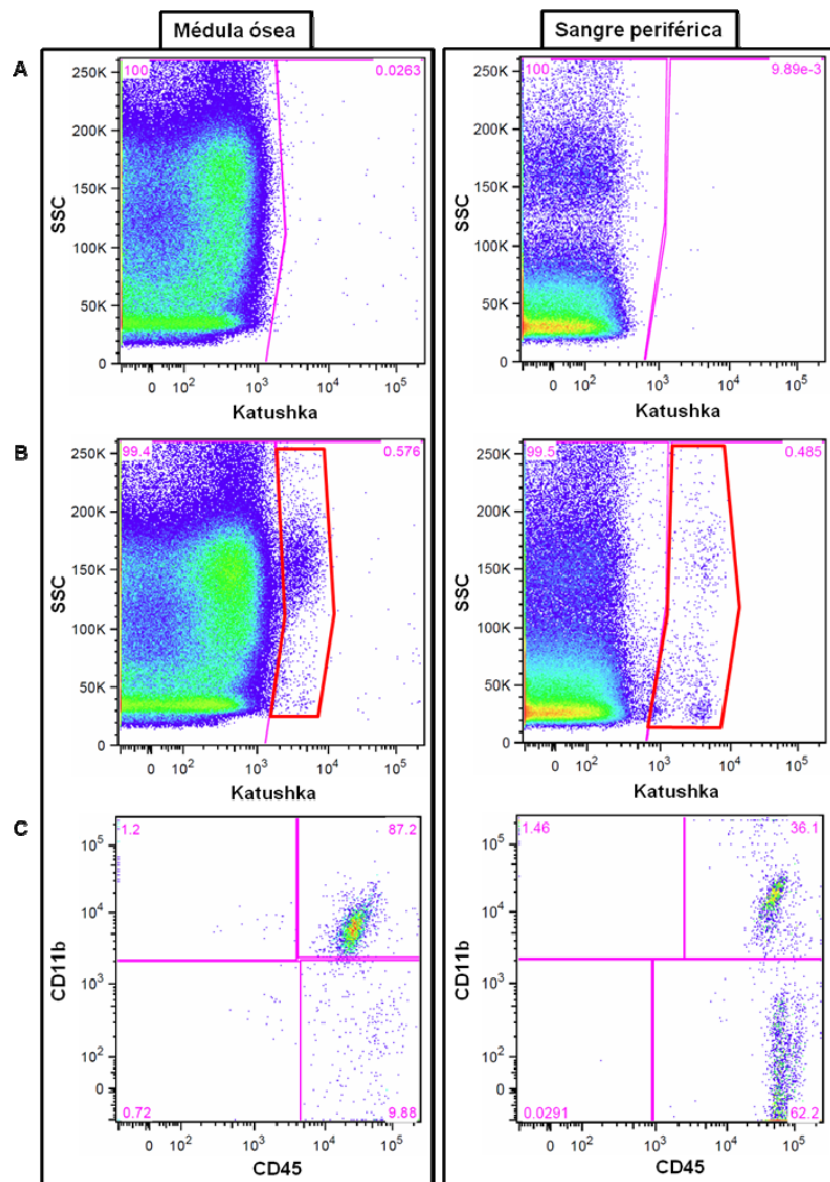
**Figura 35.** Inmunohistoquímica para  $\beta$ -galactosidasa, Lyve-1 y CD31 en órganos de animales tratados con 5mg de tamoxifeno a E10.5. El análisis se realiza una vez los animales alcanzan la edad adulta. Las cabezas de flecha negras señalan vasos linfáticos positivos para Lyve-1. Nótese que dichos vasos son débilmente positivos para CD31 y negativos para  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) en todos los tejidos analizados. En los recuadros inferiores se aprecia con más detalle la ausencia de expresión de  $\beta$ -galactosidasa en los vasos positivos para Lyve-1. Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m. Todos los animales analizados son homocigotos para los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>* y *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>*.

### 2.2.6 Análisis de la recombinación en células del linaje hematopoyético

Diversos artículos destacan la expresión de *Tie2* en distintos tipos de células hematopoyéticas (ver apartado 5.2.2 de Introducción). De hecho, los resultados obtenidos con algunos modelos transgénicos con expresión constitutiva de la recombinasa Cre bajo el control de secuencias del promotor de *Tie2* indican que alrededor del 85% de las células hematopoyéticas adultas de la médula ósea proceden de

células que expresan *Tie2* en algún momento de su desarrollo (Tang *et al.*, 2010). Por ello se procedió a analizar los niveles de recombinación detectados en células hematopoyéticas de la médula ósea y sangre periférica en animales sometidos a tratamiento con tamoxifeno durante la gestación o el desarrollo postnatal. Dadas las dificultades para la detección de  $\beta$ -galactosidasa mediante técnicas de citometría de flujo, el análisis de las poblaciones hematopoyéticas se realizó en animales homocigotos para *Tie2*<sup>CreERT2</sup> que portan una copia del alelo trazador de la actividad de Cre Tg.CAG-LSL-Katushka (descrito en detalle en el apartado 4 de Resultados).

En primer lugar se analizó la recombinación inducida en células hematopoyéticas de médula ósea y sangre periférica de animales adultos sometidos a tratamiento con tamoxifeno (5 mg) a día E12.5 del desarrollo gestacional (Figura 36). Tanto en médula ósea como en sangre periférica un 0.5-0.8% de las células totales expresan niveles detectables de fluorescencia roja (Katushka) siendo la gran mayoría de ellas (~99%) células



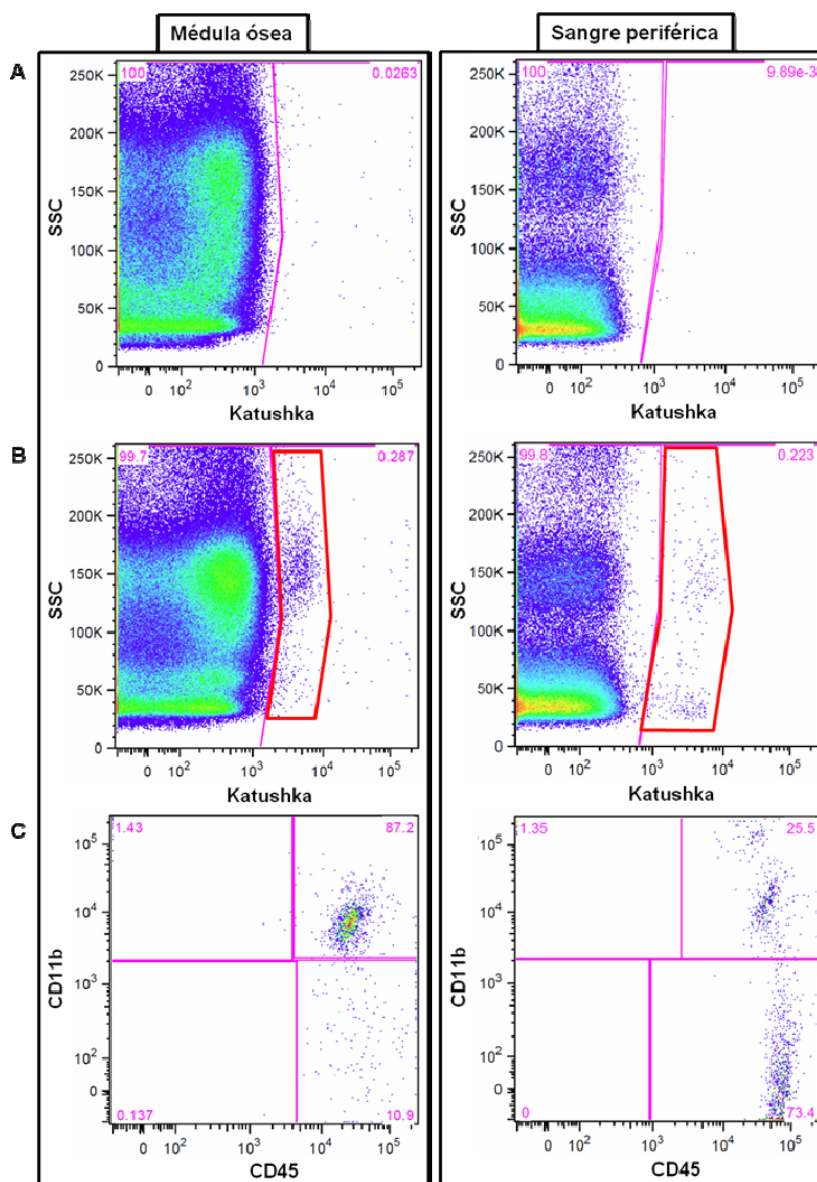
**Figura 36. Análisis de recombinación en células del linaje hematopoyético de animales tratados con tamoxifeno (5 mg) durante el desarrollo embrionario (E12.5).** Análisis de suspensiones celulares de médula ósea y sangre periférica. **A.** Muestras correspondientes a un animal de genotipo silvestre para el alelo trazador. **B.** Muestras correspondientes a un animal homocigoto para *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y hemicigoto para Tg.CAG-LSL-Katushka. La población de células que se considera positiva para Katushka se encuentra delimitada por una línea roja. **C.** Análisis de expresión de marcadores de superficie (CD45 y CD11b) en células hematopoyéticas que expresan Katushka.



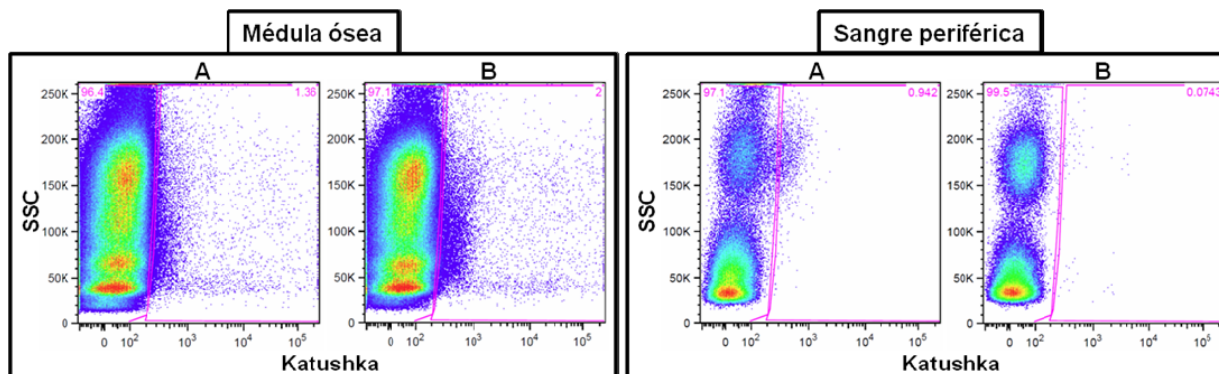
hematopoyéticas (CD45<sup>+</sup>). En la médula ósea, aproximadamente el 88% de las células hematopoyéticas (CD45<sup>+</sup>) positivas para Katushka expresan a su vez el marcador de linaje mieloide CD11b. Por su parte, en la sangre periférica, el porcentaje de células CD45<sup>+</sup> con expresión de Katushka que expresan el marcador mieloide CD11b es considerablemente inferior (~36%).

A continuación se analizó, en animales adultos, la recombinación inducida tras tratamiento con tamoxifeno durante el desarrollo postnatal temprano (50 µg de P1 a P3; Figura 37). En este caso la proporción de células de médula ósea y sangre periférica que expresan niveles detectables de Katushka es sensiblemente menor (alrededor de un 0.25%), tratándose la mayoría de ellas (~99%) de células hematopoyéticas (CD45<sup>+</sup>). En la médula ósea aproximadamente el 87% de las células positivas para Katushka expresan además de CD45 el marcador de linaje mieloide CD11b, mientras que en

la sangre periférica dicha población (Katushka<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) representa un 25% del total de células positivas para Katushka. En ambos casos los porcentajes son similares a los reportados para animales tratados durante el desarrollo gestacional, lo cual sugiere que, bajo las condiciones del presente análisis, no existen diferencias significativas en el patrón de expresión de *Tie2* en células hematopoyéticas durante el desarrollo gestacional y postnatal.



**Figura 37. Análisis de recombinación en células del linaje hematopoyético de animales tratados con tamoxifeno (50 µg) durante el desarrollo postnatal (P1-P3).** Análisis de suspensiones celulares de médula ósea y sangre periférica. **A.** Muestras correspondientes a un animal de genotipo silvestre para el alelo trazador. **B.** Muestras correspondientes a un animal homocigoto para *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y hemicigoto para Tg.CAG-LSL-Katushka. La población de células que se considera positiva para Katushka se encuentra delimitada por una línea roja. **C.** Análisis de expresión de marcadores de superficie (CD45 y CD11b) en células hematopoyéticas que expresan Katushka.



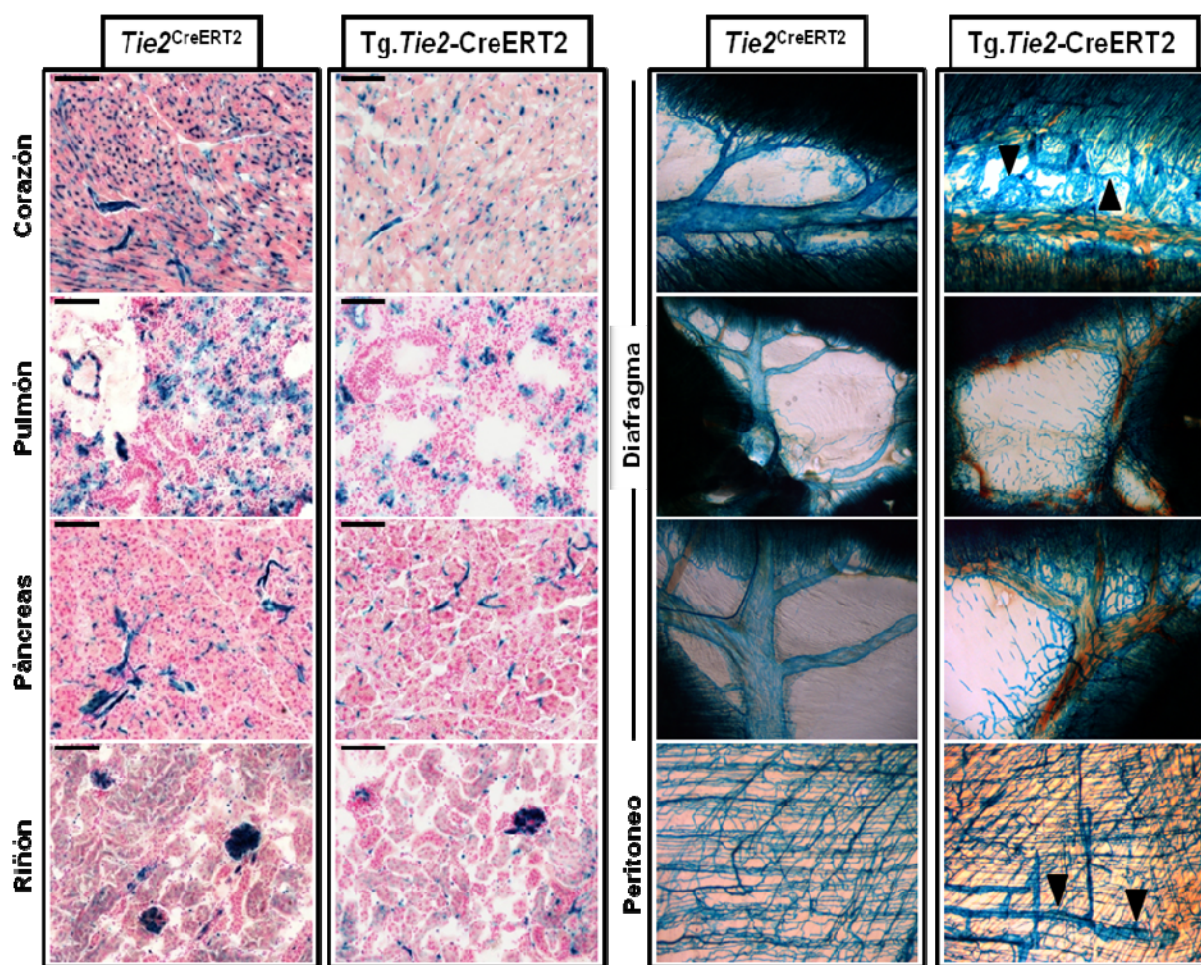
**Figura 38. Análisis de recombinación en células del linaje hematopoyético de animales tratados con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas. Análisis de suspensiones celulares de médula ósea y sangre periférica. A. Muestras correspondientes a un animal de genotipo silvestre para el alelo trazador. B. Muestras correspondientes a un animal homocigoto para *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y hemicigoto para Tg.CAG-LSL-Katushka. No se detectan células con expresión de Katushka.**

Finalmente, se analizó la presencia de células positivas para Katushka en médula ósea y sangre periférica de ratones adultos tratados con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas (Figura 38). Dicho tratamiento no es capaz de inducir recombinación detectable en poblaciones hematopoyéticas, así pues, el perfil de expresión de Katushka es indistinguible entre animales portadores del alelo Tg.CAG-LSL-Katushka o de genotipo silvestre. Este resultado sugiere que en animales adultos la expresión de *Tie2* en células del linaje hematopoyético es inferior a la necesaria para dirigir niveles detectables de recombinación mediados por Cre, al menos con el modelo generado y descrito en esta memoria.

## 2.2.7 Comparación con modelos transgénicos de recombinación inducible basados en *Tie2*

Si bien, el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> descrito en esta tesis es el primer sistema de recombinación inducible en el endotelio vascular sanguíneo generado mediante *gene targeting*, existen otros modelos generados previamente mediante transgénesis convencional. Dos de ellos utilizan secuencias reguladoras de expresión del gen *Tie2* para dirigir la expresión de CreERT2: uno, ampliamente utilizado en la literatura, a partir del promotor y primer intrón de *Tie2* (Forde *et al.*, 2002) y otro, desarrollado en paralelo a este trabajo, en el que la secuencia codificante de la recombinasa se introdujo en el primer codón codificante (ATG) del gen *Tie2* contenido en un BAC (Korhonen *et al.*, 2009). La disponibilidad del primero de estos modelos en nuestro laboratorio nos ha permitido establecer una comparación directa de su inducibilidad y especificidad con el sistema *knockin* descrito en este trabajo.

Con el objetivo de uniformizar al máximo las condiciones de inducción y análisis en la comparación de ambos modelos, se utilizaron animales hemicigotos y heterocigotos para los alelos transgénico Tg.*Tie2*-CreERT2 y *knockin Tie2*<sup>CreERT2</sup>, respectivamente, y heterocigotos para el alelo trazador *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>. A todos ellos se les administró dieta con tamoxifeno durante cinco u ocho semanas consecutivas y se analizó el nivel de recombinación mediante tinción X-gal en criosecciones o en preparación completa (Figura 39). Los resultados obtenidos indican que nuestro modelo *knockin* induce la recombinación de manera más eficiente y con mayor especificidad por el endotelio vascular sanguíneo. Así pues, en dicho modelo la expresión de  $\beta$ -galactosidasa es generalizada

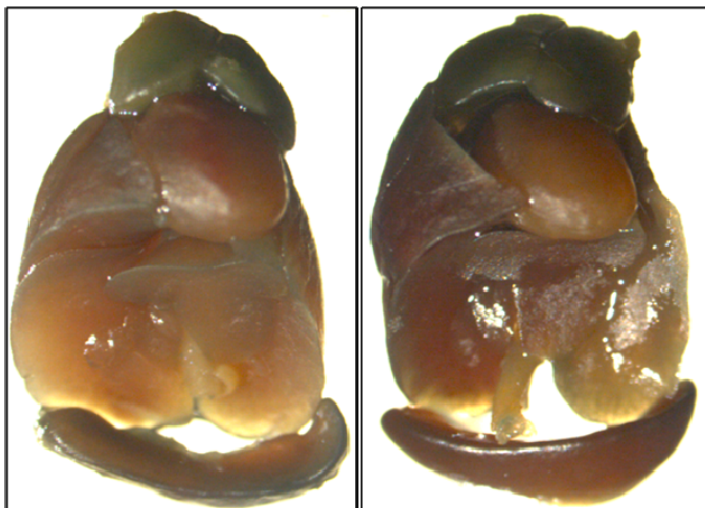


**Figura 39. Comparación de eficiencia y especificidad de recombinación inducida con el modelo *knockin* generado (*Tie2<sup>CreERT2</sup>*) respecto a un modelo transgénico (*Tg.Tie2-CreERT2*) reportado previamente (Forde *et al.*, 2002). En el panel de la izquierda se muestran tinciones X-gal en criosecciones de órganos de animales tratados con tamoxifeno en la dieta durante cinco semanas consecutivas. Las barras de escala equivalen a 100  $\mu$ m. En el panel de la derecha se muestran tinciones X-gal en preparación completa de diafragma y peritoneo de animales tratados con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas consecutivas. Las cabezas de flecha señalan vasos linfáticos positivos para  $\beta$ -galactosidasa en el modelo transgénico.**

y homogénea en todas las células en el endotelio vascular sanguíneo y la recombinación en el endotelio linfático es prácticamente indetectable. Por su parte, en el modelo transgénico los vasos sanguíneos presentan un alto grado de mosaicismo en cuanto a la expresión de  $\beta$ -galactosidasa y es frecuente la detección de vasos linfáticos positivos para dicho marcador.

Por otra lado, previamente se ha descrito la ocurrencia de recombinación en la línea germinal de hembras que expresan Cre bajo secuencias promotoras y potenciadoras de *Tie2* (de Lange *et al.*, 2008). Por ello, se procedió a analizar si en el modelo *knockin* *Tie2<sup>CreERT2</sup>* se producía dicho efecto tras la inducción con tamoxifeno. Obviamente, la ocurrencia de recombinación en la línea germinal limita sensiblemente las aplicaciones de modelos diseñados para la inducción de recombinación tejido-específica, por lo que resulta fundamental comprobar si dicha situación es inherente a la expresión endógena de *Tie2* o es una característica artefactual de algunos modelos transgénicos.





**Figura 40. Análisis de recombinación en crías de hembras tratadas con tamoxifeno en la dieta antes de la gestación.** Se muestra el timo, corazón, pulmones y bazo de dos crías que provienen de dos hembras tratadas con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas consecutivas. La ausencia de tinción azul evidencia que en el modelo *knockin* generado no existe expresión de *Tie2* y por tanto de CreERT2 en la línea germinal de la hembra.

Para ello, hembras homocigotas para *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> tratadas con dieta con tamoxifeno durante ocho semanas consecutivas a partir del destete, fueron puestas en cruce con machos de genotipo silvestre. En consecuencia, toda la descendencia resulta heterocigota para los dos alelos *knockin* por herencia materna; en caso de existir recombinación en la línea germinal, algunas o todas las crías deberían heredar una versión recombinada y por tanto activa del alelo trazador y expresarían  $\beta$ -galactosidasa de forma constitutiva en todas las células de su organismo. Mediante tinción X-gal en preparación completa, se analizó la expresión de  $\beta$ -galactosidasa en el timo,

corazón, pulmones y bazo de 18 crías procedentes de cuatro hembras sin que en ninguna de las crías analizadas se apreciara tinción azul (Figura 40). Así pues, puede concluirse que en el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> no existe expresión de la recombinasa en la línea germinal de la hembra. Dado que dicho modelo *knockin* reproduce el patrón de expresión endógeno de *Tie2*, resulta evidente que la actividad de las secuencias promotoras y potenciadoras de *Tie2* en la línea germinal de las hembras no es una característica propia de dicho gen sino un efecto observado en algunas líneas transgénicas quizá debido a efectos posicionales asociados al sitio de integración del transgén.

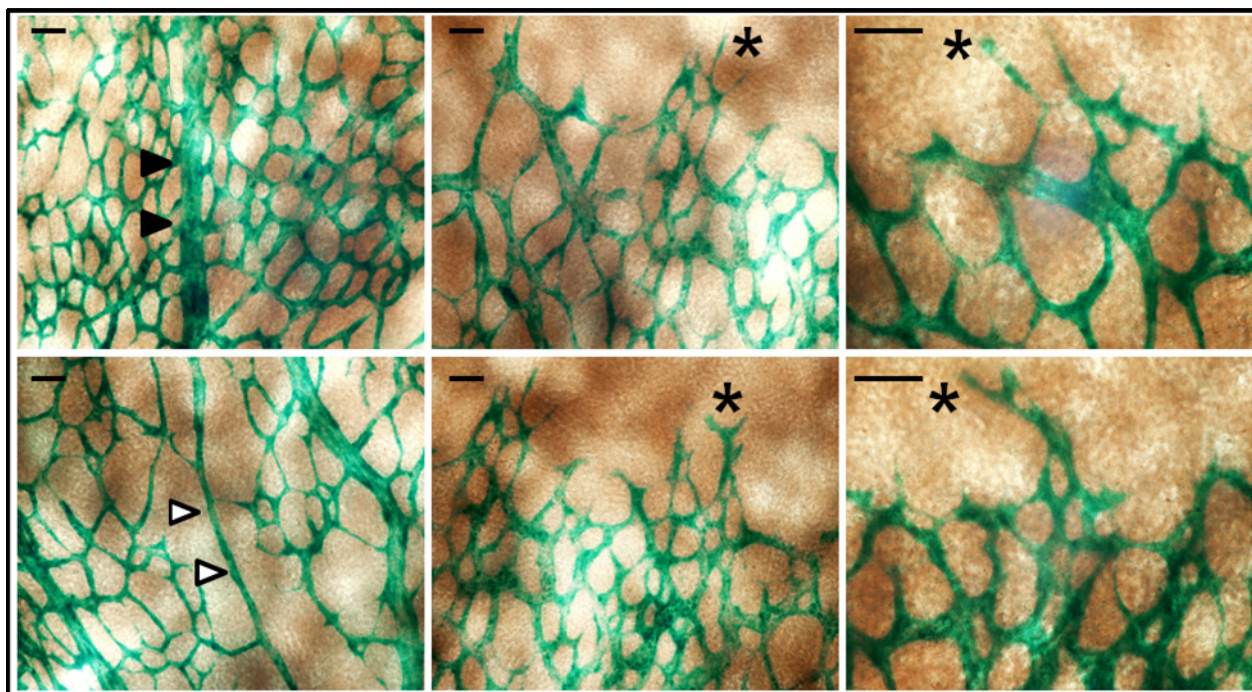
### 2.2.8 Visualización y análisis del desarrollo vascular de la retina

La retina del ratón ha sido ampliamente utilizada en las últimas décadas como un modelo experimental para el estudio de la angiogénesis y actualmente constituye una herramienta potente y bien caracterizada para la investigación *in vivo* de los mecanismos que gobiernan la neovascularización fisiológica y patológica (Stahl *et al.*, 2010). Al momento del nacimiento, las crías de ratón presentan una vasculatura retinal inmadura y persistencia de los vasos hialoideos. Estos últimos sufren una intensa regresión durante los primeros días postparto, al tiempo que se va formando la vasculatura intrarretinal definitiva, a lo largo de un proceso estrictamente regulado temporal y espacialmente que puede ser fácilmente observado y manipulado experimentalmente (Saint-Geniez and D'Amore, 2004; Stahl *et al.*, 2010). En este sentido, la disponibilidad de modelos genéticos que permitan modificar condicionalmente la expresión genética en el endotelio constituye un aporte relevante para el estudio de fenotipos vasculares durante la angiogénesis retinal. Por ello, se procedió a evaluar la capacidad del modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> para inducir recombinación en el endotelio vascular de la retina en animales portadores del alelo reportero *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>.

### 2.2.8.1 Nueva herramienta para el estudio de fenotipos vasculares en la retina

En función del momento seleccionado para analizar la vasculatura de la retina, distintos procesos de la neovascularización pueden ser estudiados. Así pues, la administración intragástrica de 50  $\mu$ g de tamoxifeno durante los tres primeros días de vida permite inducir recombinación durante una ventana temporal en la que predominan los eventos de brotación angiogénica. Por su parte, la administración de 100  $\mu$ g de tamoxifeno, por la misma vía, durante los días cinco a ocho postparto, induce recombinación durante un período en el que la mayor parte de la vasculatura sufre procesos de remodelación y maduración (Pitulescu *et al.*, 2010).

Dichos protocolos de administración de tamoxifeno han sido ensayados en ratones homocigotos para los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> y ambos inducen marcada recombinación en la mayoría de las células endoteliales de la vasculatura en desarrollo. Mediante tinción X-gal de las retinas en preparación completa (ver apartado 2.4.2 de Materiales y Métodos), es posible distinguir con facilidad los detalles morfológicos de las redes en formación, la emisión de filopodios por parte de las células endoteliales que lideran la brotación y las nuevas interconexiones entre vasos adyacentes (Figura 41). Si se considera que, en cruce con modelos *knockout* condicionales, la mayoría de las células que expresan el marcador  $\beta$ -galactosidasa habrán perdido al mismo tiempo la actividad de un gen en particular, es predecible la potencialidad de este modelo para el análisis genético de los mecanismos de regulación angiogénica en la retina del ratón.



**Figura 41. Análisis de recombinación en la vasculatura de la retina de crías a P7.** Las crías fueron tratadas con 50  $\mu$ g de tamoxifeno de P1 a P3. Tinción X-gal en preparación completa. En las imágenes de la izquierda se señala la presencia de una vena (cabezas de flecha negras) y una arteria (cabezas de flecha blancas). Se indica mediante asteriscos los eventos de brotación en el borde angiogénico de la vasculatura en desarrollo. Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m. Todos los animales analizados son homocigotos para *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>.

### 2.2.8.2 Análisis de la expresión de *Tie2* en la vasculatura de la retina

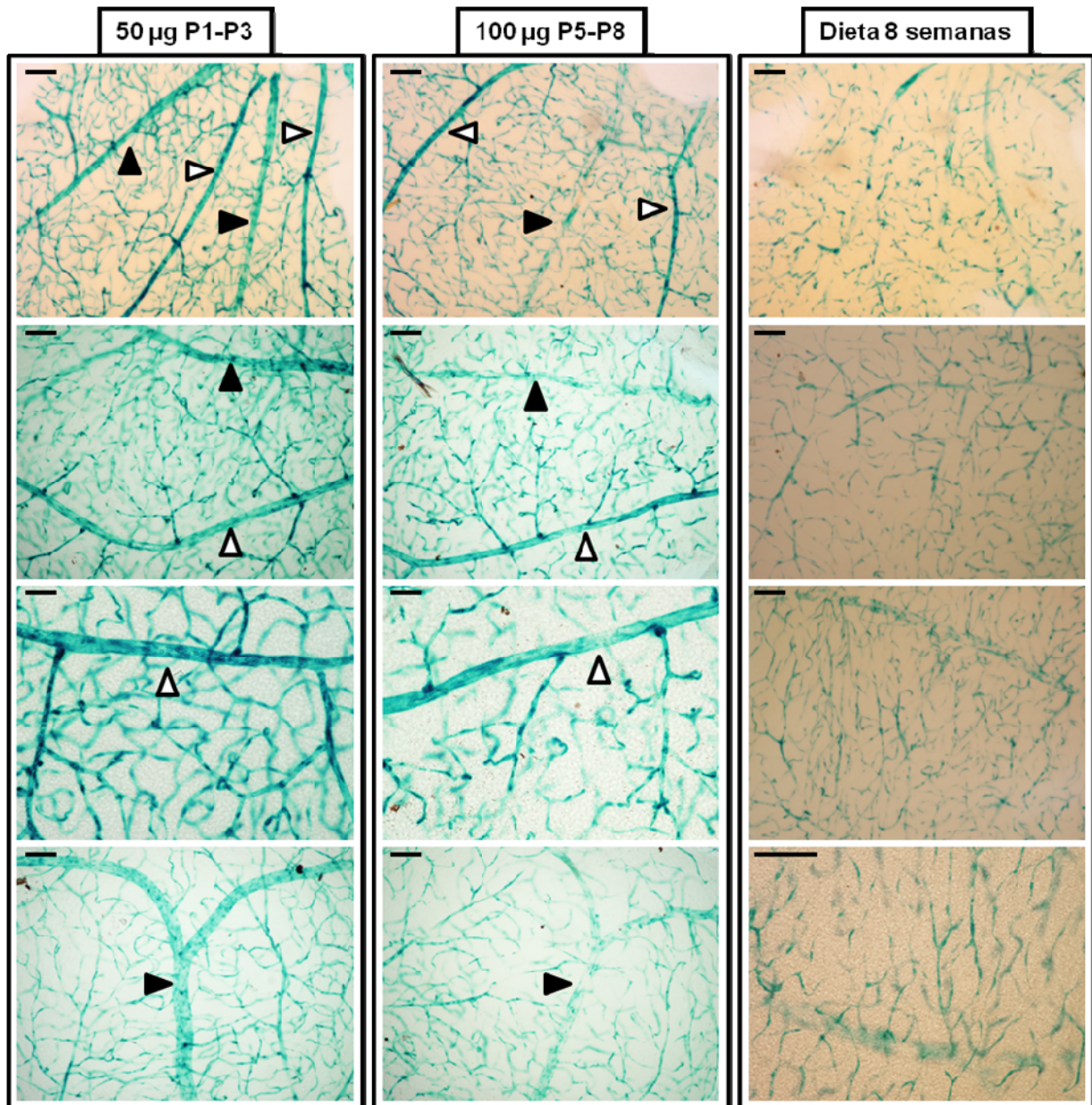
Considerando que, de acuerdo a lo descrito en la literatura, *Tie2* se expresa de forma constitutiva y a bajos niveles en la vasculatura quiescente y que es sobreexpresado en vasos que participan activamente en procesos de neovascularización (Augustin *et al.*, 2009), resulta interesante analizar si dichas diferencias en los niveles de expresión se producen también durante el proceso de vascularización de la retina. Para ello, se analizaron las retinas de ratones adultos, portadores de los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> en homocigosis, tras la inducción de recombinación mediante diferentes protocolos de administración de tamoxifeno en el periodo perinatal y tras el destete. Así pues, varios animales fueron tratados con tamoxifeno siguiendo los protocolos para inducción perinatal (50 µg de P1 a P3 ó 100 µg de P5 a P8), momento en el cual la vasculatura de la retina se está desarrollando y por ende la neovascularización es muy activa; por su parte, otro grupo de animales fue tratado con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas consecutivas a partir del destete, momento en el cual la vasculatura de la retina se encuentra totalmente establecida y en consecuencia la mayoría del endotelio se encontrará en quiescencia. Mediante tinción X-gal en preparación completa se comparó el nivel de expresión de β-galactosidasa en la vasculatura de la retina en estas condiciones (Figura 42).

Los resultados obtenidos reflejan que la expresión de *Tie2* en la vasculatura de la retina es mayor durante los primeros tres días después del nacimiento, momento en el cual los eventos de neovascularización son especialmente frecuentes y abundantes. Así pues, las retinas de los animales que fueron sometidos a dicho protocolo de inducción reflejan el mayor grado de tinción positiva para β-galactosidasa en el endotelio vascular de arterias y venas. Por su parte, la inducción durante P5 a P8 evidencia que la expresión de *Tie2* durante dicho período continúa siendo alta, en concordancia con la participación de *Tie2* en los procesos de maduración vascular (Augustin *et al.*, 2009; Kidoya *et al.*, 2008); sin embargo, durante dicho período la expresión de *Tie2* disminuye en el endotelio vascular del compartimento venoso en comparación con la expresión existente durante P1 a P3. Finalmente, la inducción con dieta tamoxifeno durante ocho semanas consecutivas no es capaz de inducir niveles de recombinación comparables a aquellos conseguidos con la administración perinatal de tamoxifeno. Así pues, los niveles de expresión de *Tie2* en la vasculatura quiescente de la retina son bastante menores que los detectados durante la primera semana de desarrollo postnatal.

En sentido general, la expresión de *Tie2* en la vasculatura de la retina es más homogénea y notoria durante los primeros días del desarrollo postnatal (P1 a P3), probablemente asociada al alto nivel de neovascularización en este órgano. A medida que la red vascular primitiva se establece y comienza a madurar, existe una disminución en la expresión de *Tie2* en el endotelio vascular del compartimento venoso. Una vez establecida la red vascular madura, la expresión de *Tie2* es menor y se limita fundamentalmente a los capilares con escasa o nula expresión en arterias y venas.

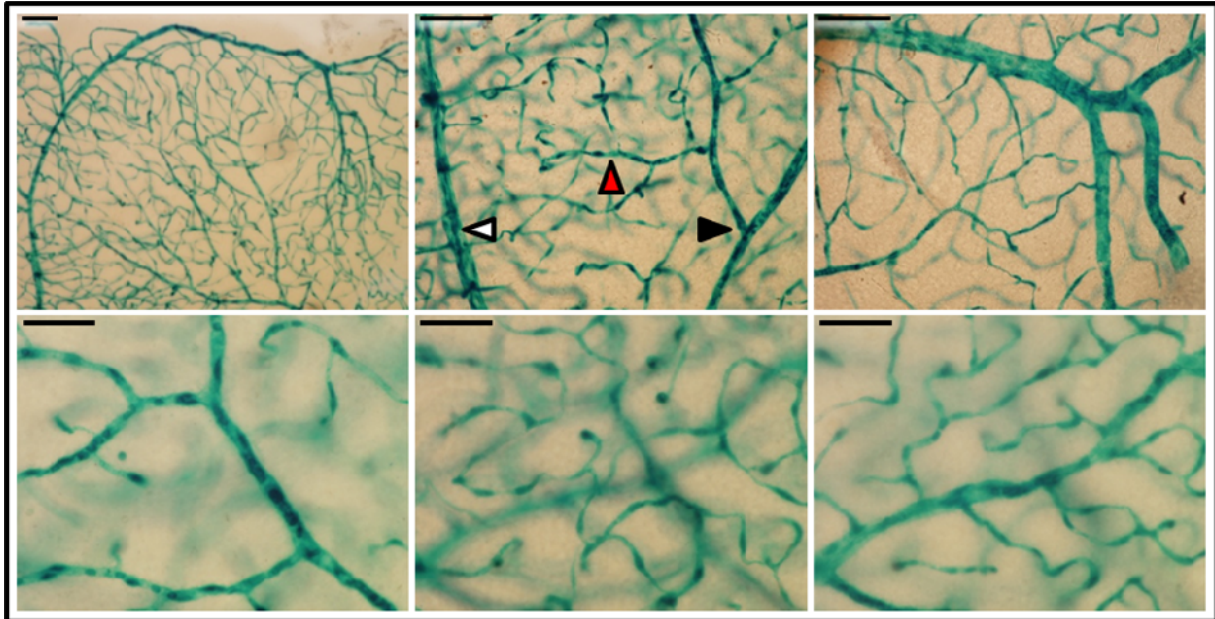
Dado que la vasculatura de la retina del ratón se desarrolla íntegramente a partir del nacimiento, resulta interesante analizar si el endotelio vascular de la retina procede de células que expresan *Tie2*





**Figura 42. Análisis de expresión de *Tie2* en la vasculatura de la retina en diferentes estadios.** Tinción X-gal en preparación completa de retinas de animales adultos tratados con tamoxifeno durante el desarrollo perinatal (50 µg de P1 a P3 ó 100 µg de P5 a P8) o tras el destete (ocho semanas de dieta). Las venas se señalan con cabezas de flecha negras, las arterias con cabezas de flecha blancas. Las barras de escala equivalen a 50 µm. Animales homocigotos para *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>.

desde etapas tempranas del desarrollo embrionario, o bien si la diferenciación y consecuente adquisición del fenotipo endotelial (que incluye, entre otras características, la expresión de *Tie2*) se adquiere en un momento posterior, por ejemplo durante las etapas previas al nacimiento o directamente durante el desarrollo postnatal. Para ello se analizó, mediante tinción X-gal en preparación completa, la retina de ratones adultos que habían sido tratados con tamoxifeno durante el desarrollo embrionario (administración de 5 mg de tamoxifeno a hembras gestantes a E10.5). Los resultados obtenidos (Figura 43) reflejan que a E10.5 las células que darán origen al endotelio de la vasculatura de la retina ya han adquirido un compromiso por el fenotipo endotelial, a juzgar por sus altos niveles de expresión de *Tie2*, lo cual se traduce en una eficiente recombinación del locus reportero *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> en este momento del



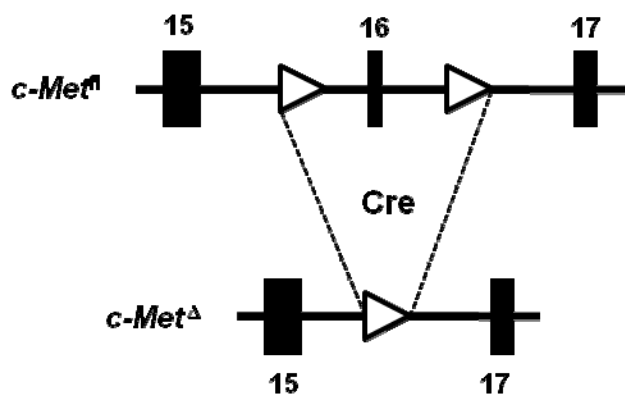
**Figura 43. Análisis de la contribución de células que expresan *Tie2* durante el desarrollo embrionario a la vasculatura de la retina.** Tinción X-gal en preparación completa de retinas de animales adultos tratados con tamoxifeno durante el desarrollo embrionario (5 mg a E10.5). Las tres imágenes del panel superior muestran tres áreas distintas de la vasculatura de la retina; las barras de escala equivalen a 50  $\mu\text{m}$ . Se señala una vena (cabeza de flecha blanca), una arteria (cabeza de flecha negra) y capilares (cabeza de flecha roja). Las tres imágenes del panel inferior corresponden a tres planos distintos de la misma área y muestran las tres capas vasculares que se encuentran superpuestas en la retina de un ratón adulto; las barras de escala equivalen a 25  $\mu\text{m}$ . Todos los animales analizados son homocigotos para los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>.

desarrollo embrionario y la consecuente expresión de  $\beta$ -galactosidasa en todos los vasos sanguíneos de la retina. La uniformidad en la expresión de dicho marcador en arterias y venas refleja el origen común de dichas estructuras y descarta que las variaciones detectadas entre ellas, utilizando otros protocolos de inducción, se deban a una distinta habilidad del endotelio vascular arterial o venoso para expresar la  $\beta$ -galactosidasa. Estoy apoya que la red vascular de la retina se forma fundamentalmente por angiogénesis a partir de un primordio vascular ya existente al nacimiento y formado por células que han adquirido un fenotipo endotelial desde el desarrollo embrionario temprano.

### 3. Inactivación inducible de c-Met en el endotelio vascular sanguíneo

El objetivo fundamental de la creación del modelo murino *Tie2*<sup>CreERT2</sup> es el desarrollo de una herramienta capaz de dirigir alteraciones genéticas específicamente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. De esta forma es posible el análisis genético de los mecanismos de regulación molecular que gobiernan el desarrollo del sistema circulatorio y su participación en la respuesta a demandas fisiológicas o en la patogenia de diversas enfermedades.

La ruta de señalización mediada por el receptor tirosina quinasa c-Met ha sido ampliamente asociada a la capacidad angiogénica durante la vascularización tumoral y a la capacidad metastática de las células tumorales (ver apartados 4.5 y 4.6 de Introducción), pero se desconoce si su acción es



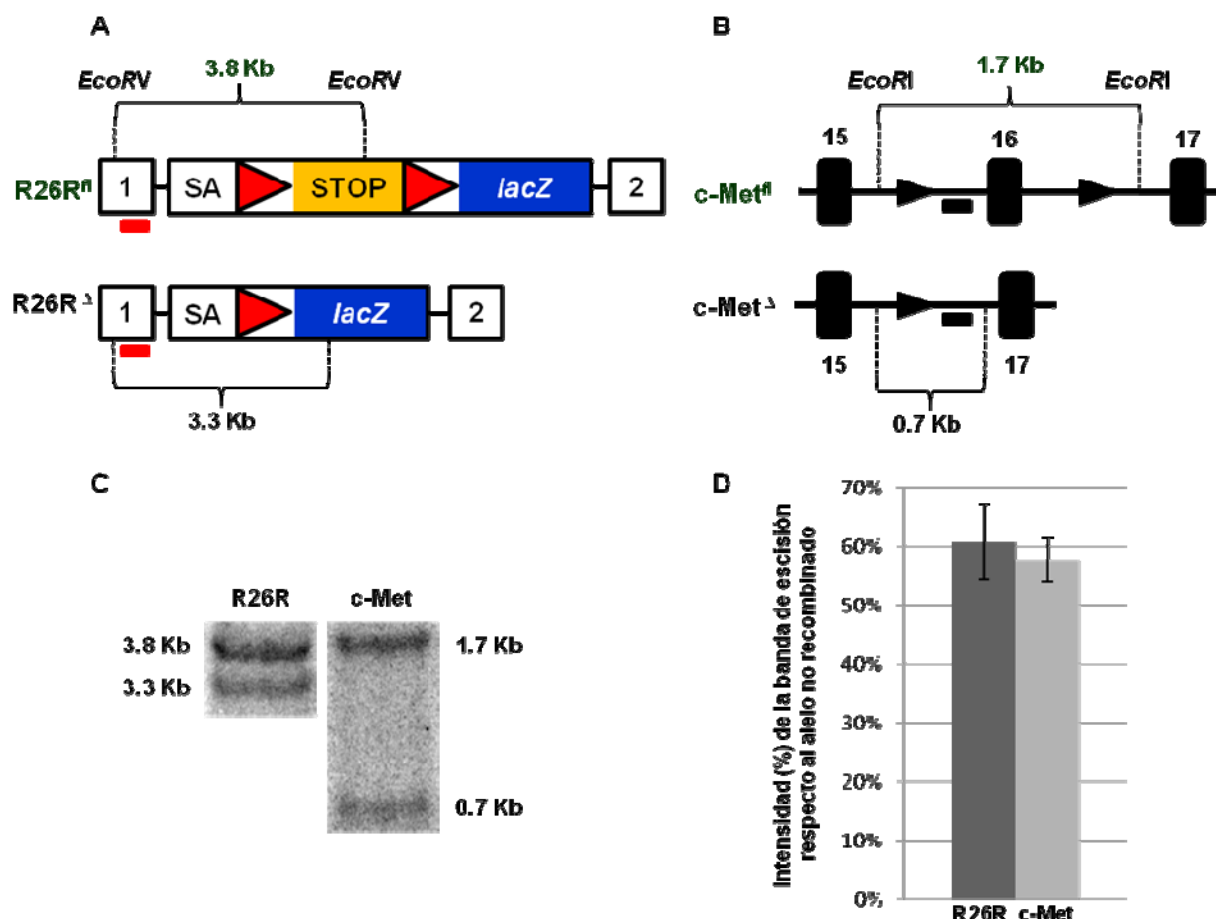
**Figura 44. Delección condicional del exón 16 del gen *c-Met* murino.** En el alelo condicional (*c-Met<sup>fl</sup>*) el exón 16 (representado con rectángulo negro) se encuentra flanqueado por sitios *loxP* (representados por triángulos blancos). Tras el evento de recombinação mediado por Cre se obtiene el alelo escindido (*c-Met<sup>Δ</sup>*) que carece del exón 16.

mediada por efectos celulares autónomos en el endotelio vascular. Con el objetivo de analizar *in vivo* la función específica de *c-Met* en la transmisión de señales intracelulares en las células endoteliales, el modelo *Tie2<sup>CreERT2</sup>* se cruzó con una línea *knockout* condicional de *c-Met* (*c-Met<sup>fl</sup>*) en la que el exón 16 del gen *c-Met*, que codifica para el dominio de unión a ATP en la región intracelular del receptor, se encuentra flanqueado por sitios *loxP* (Huh *et al.*, 2004). Así pues, la recombinação mediada por Cre genera una forma del receptor incapaz de utilizar el ATP, anulando su actividad tirosina quinasa y por tanto su función en la señalización intracelular mediada por fosforilación (Figura 44).

Tras varias series de cruce entre ratones *Tie2<sup>CreERT2</sup>*, *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>* y aquellos portadores del alelo *knockout* condicional de *c-Met* (*c-Met<sup>fl</sup>*), se seleccionaron animales que permiten el mantenimiento de la línea mediante cruces entre machos homocigotos para los tres alelos y hembras homocigotas para los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>*, *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>* y heterocigotas para *c-Met<sup>fl</sup>*. De esta forma, en cada camada se obtiene una proporción similar de ratones homocigotos y heterocigotos para *c-Met<sup>fl</sup>* al tiempo que los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>* y *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>* se conservan en homocigosis. La administración de tamoxifeno a los animales homocigotos para *c-Met<sup>fl</sup>* induce la inactivación específica del receptor en las células que expresan *Tie2* (*c-Met<sup>ΔTie2</sup>*), además de inducir la expresión del marcador  $\beta$ -galactosidasa en el locus *Rosa26*. Por su parte, la recombinação de un único alelo de *c-Met* (*c-Met<sup>+/Δ</sup>*) no impide la actividad normal de dicho receptor (Bladt *et al.*, 1995), por lo que dichos animales se comportan como ratones de genotipo silvestre y por tanto se utilizan como control en todos los experimentos.

Dadas las diferencias existentes en la facilidad con la que recombinan distintos locus (Vooijs *et al.*, 2001), y con el objeto de poder estimar el nivel de recombinação en *c-Met* mediante seguimiento de la expresión de  $\beta$ -galactosidasa en nuestro modelo, es importante comprobar que la eficiencia de recombinação para *c-Met* y *Rosa26* es comparable. Para ello, mediante *Southern Blot* se analizó la abundancia relativa de los alelos recombinados respecto a aquellos sin escindir en muestras de varios órganos de animales homocigotos para *Tie2<sup>CreERT2</sup>*, *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>* y *c-Met<sup>fl</sup>* tratados con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas. Como puede observarse en la figura 45, la frecuencia de recombinação para ambos locus es prácticamente la misma por lo que puede asumirse que las células positivas para  $\beta$ -galactosidasa habrán sufrido también recombinação en el locus que codifica para *c-Met*.





**Figura 45. Análisis por Southern Blot de la recombinación inducida en los locus de *Rosa26* y *c-Met*.** A. Representación esquemática del locus *Rosa26* de la línea trazadora *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>* (R26R). Se indican los sitios de restricción de *EcoRV*, los fragmentos esperados para el alelo trazador previa recombinación (R26R<sup>fl</sup>: 3.8 Kb) y después de la misma (R26R<sup>Δ</sup>: 3.3 Kb). La sonda genómica utilizada se representa con un rectángulo rojo. B. Representación esquemática del locus *c-Met* de la línea *knockout* condicional. Se indican los sitios de restricción de *EcoRI*, los fragmentos esperados previa recombinación (*c-Met*<sup>fl</sup>: 1.7 Kb) y después de la misma (*c-Met*<sup>Δ</sup>: 0.7 Kb). La sonda genómica utilizada se representa con un rectángulo negro. C. Análisis por Southern Blot de la recombinación inducida tras administración de tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas. D. Relación porcentual ( $\pm$ SEM) que representa la banda de escisión respecto a la banda del alelo no recombinado para cada uno de los locus analizados.

### 3.1 Inactivación de c-Met durante el desarrollo embrionario

La ablación de la ruta de señalización mediada por HGF/c-Met mediante el uso de ratones *knockout* constitutivos para HGF o c-Met provoca letalidad embrionaria alrededor de E16.5 debido a múltiples alteraciones sistémicas (Maina *et al.*, 1996; Maina *et al.*, 1997; Maina *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 1995). Sin embargo, hasta la fecha no se ha abordado la importancia de dicha vía de señalización en el desarrollo y función de las células endoteliales *in vivo* mediante modelos *knockout* condicionales. Así pues, el primer objetivo planteado consistió en comprobar si la inactivación de c-Met específicamente en el endotelio vascular sanguíneo, provoca un fenotipo detectable durante el desarrollo embrionario. Para ello, se establecieron cruces entre hembras heterocigotas y machos homocigotos para el alelo *c-Met*<sup>fl</sup>, siendo todos ellos homocigotos para los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>, y se administró a las hembras gestantes una dosis de 5 mg de tamoxifeno por vía IP a día E10.5 de gestación. Es importante

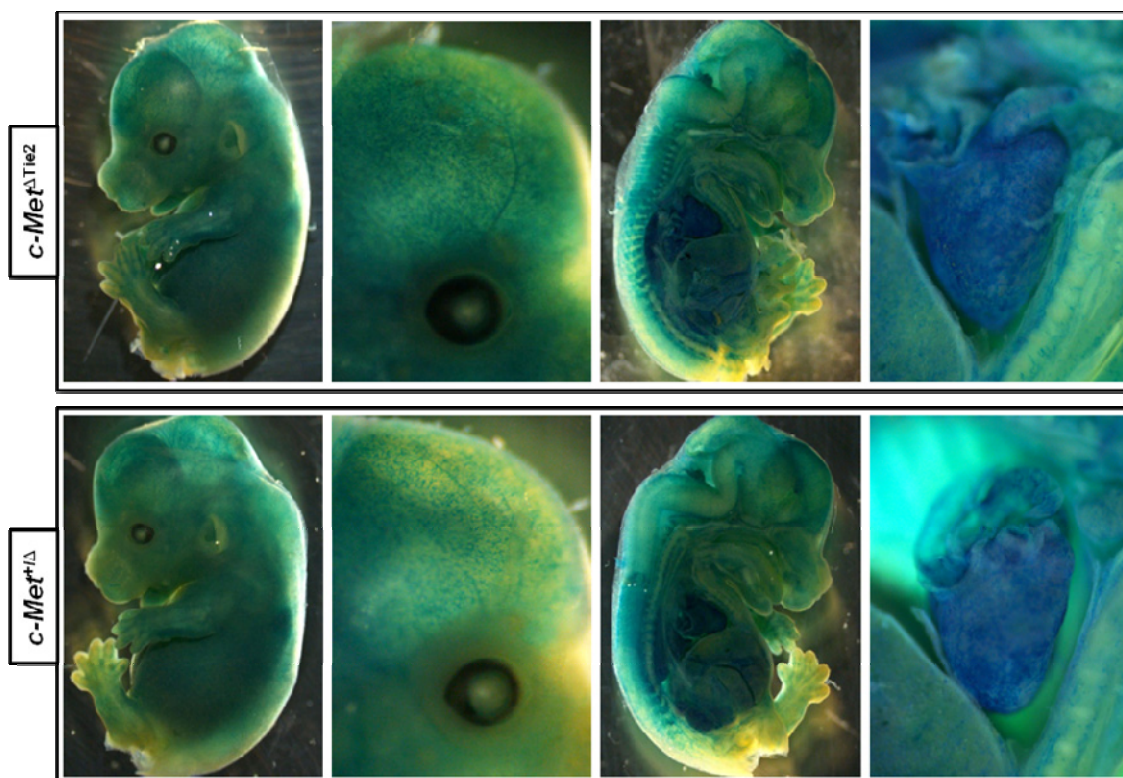
Edad gestacional	No. de crías	Crías <i>c-Met<sup>ΔTie2</sup></i>	Crías <i>c-Met<sup>+/Δ</sup></i>
E13.5	6	2	4
	9	2	7
E16.5	3	1	2
	8	4	4
E19.5	4	3	1
	10	7	3
TOTAL	40	19	21
Porcentaje	100	47.5	52.5

**Tabla 4. Cantidad de crías vivas y genotipo de las mismas a distintas edades gestacionales tras administración de 5 mg de tamoxifeno a E10.5 a hembras gestantes. Las hembras, homocigotas para los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>* y *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>*, y heterocigotas para *c-Met<sup>fl</sup>*, fueron cruzadas con machos homocigotos para los tres alelos; por ello, el 50% de las crías se espera que sean homocigotas para *c-Met<sup>fl</sup>* (*c-Met<sup>ΔTie2</sup>* tras administración de tamoxifeno) y el 50% restante heterocigotas para *c-Met<sup>fl</sup>* (*c-Met<sup>+/Δ</sup>* tras administración de tamoxifeno).**

conservan una copia funcional de *c-Met* en diferentes momentos del desarrollo embrionario (E13.5, E16.5 y E19.5). El análisis de la viabilidad embrionaria (ver Tabla 4) refleja que no existen diferencias significativas ( $p = 0.7895$ ) en la supervivencia de los embriones *c-Met<sup>ΔTie2</sup>* respecto a sus hermanos de camada *c-Met<sup>+/Δ</sup>*. Tampoco es posible detectar ningún defecto macroscópico en los embriones y la tinción X-gal en preparación completa (Figura 46) refleja que el patrón y los niveles de recombinación inducidos son similares en los dos genotipos estudiados.

destacar que todas las hembras tratadas fueron heterocigotas para el alelo *c-Met<sup>fl</sup>* con el fin de evitar la inactivación materna de *c-Met* y restringirla exclusivamente a los embriones homocigotos para dicho alelo.

Inicialmente se evaluó la viabilidad de los embriones *c-Met<sup>ΔTie2</sup>* (aquellos que, al ser homocigotos para el alelo *c-Met<sup>fl</sup>*, pierden la señalización de *c-Met* en las células que expresen *Tie2*) y *c-Met<sup>+/Δ</sup>* (aquellos que, al ser heterocigotos para el alelo *c-Met<sup>fl</sup>*,

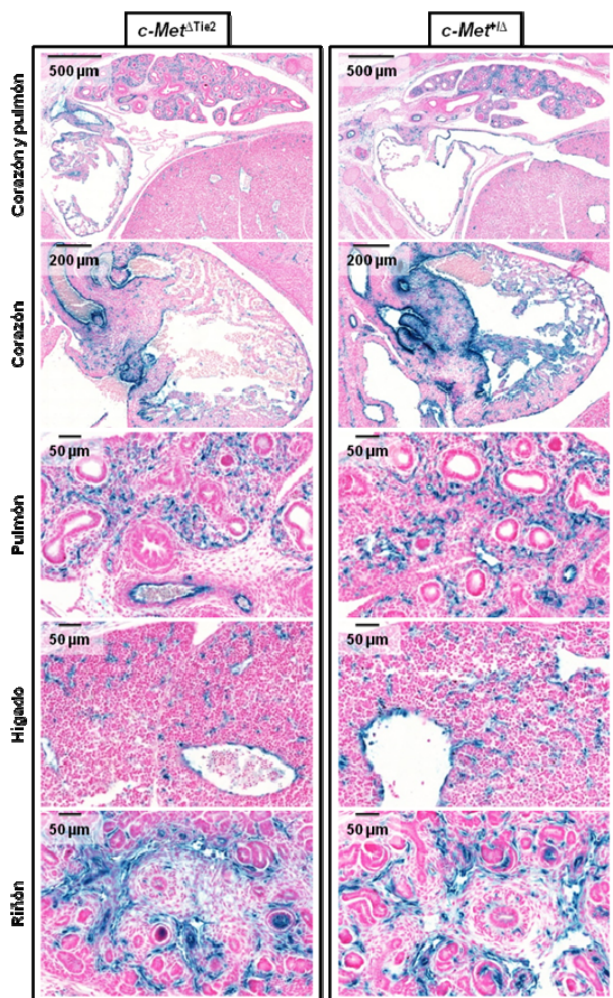


**Figura 46. Tinción X-gal en preparación completa de embriones *c-Met<sup>ΔTie2</sup>* y *c-Met<sup>+/Δ</sup>*. Embriones a E14.5 tras administración IP de 5 mg de tamoxifeno a E10.5. No se aprecian diferencias morfológicas ni en el patrón de recombinación inducido entre animales *c-Met<sup>ΔTie2</sup>* y *c-Met<sup>+/Δ</sup>*.**

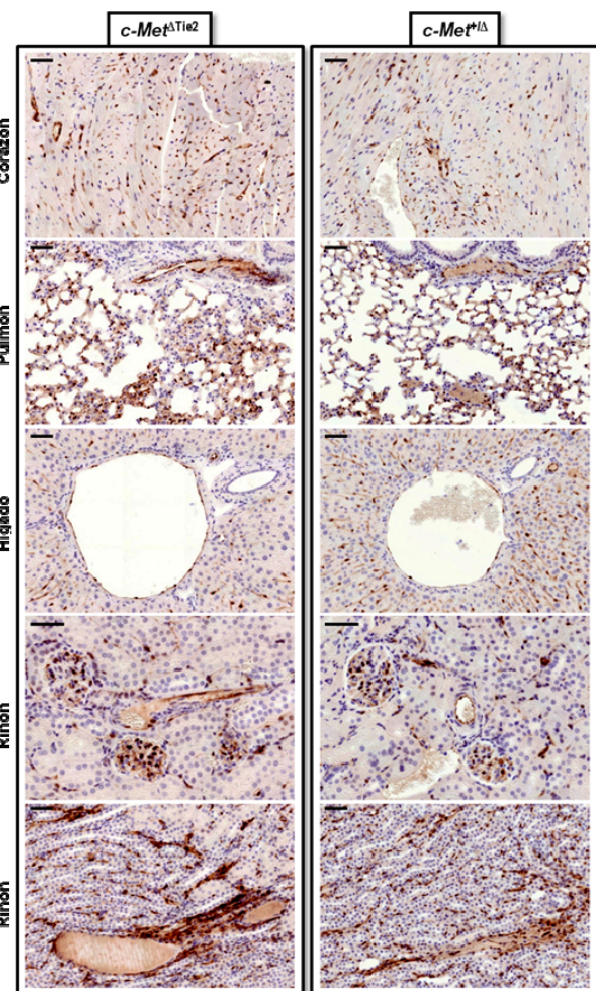


Un análisis histológico más pormenorizado permite concluir que la abundancia relativa de estructuras vasculares positivas para  $\beta$ -galactosidasa es indistinguible entre ratones  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Tie2}}$  y  $c\text{-Met}^{+/Δ}$  (Figura 47) y que en los primeros no se aprecian deficiencias o alteraciones en la vascularización de los órganos analizados (corazón, pulmón, hígado y riñón).

A continuación, se procedió al análisis de la vasculatura en animales adultos, de 12 semanas de edad, en los que se inactivó c-Met durante el desarrollo embrionario (5 mg de tamoxifeno a E10.5). Al aumentar el tiempo transcurrido entre la inducción de recombinación y el análisis fenotípico, se incrementa la posibilidad de que se manifiesten las posibles alteraciones asociadas a la deficiencia de c-Met. Sin embargo, incluso siguiendo esta estrategia no fue posible detectar diferencias en la vascularización de los principales órganos de animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Tie2}}$  y  $c\text{-Met}^{+/Δ}$  (Figura 48). Igualmente, la abundancia relativa de estructuras vasculares positivas para  $\beta$ -galactosidasa en los órganos analizados es la misma en animales de ambos genotipos, lo cual sugiere que la deficiencia de c-Met no afecta la capacidad contributiva de las células endoteliales a la neovascularización fisiológica. Así pues, el porcentaje de células  $\text{CD31}^+$  que expresan  $\beta$ -galactosidasa, es del 70,72% en los animales  $c\text{-Met}^{+/Δ}$  y del 71,07% en los  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Tie2}}$ .



**Figura 47. Tinción X-gal en secciones de parafina de embriones  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Tie2}}$  y  $c\text{-Met}^{+/Δ}$ . Embriones a E14.5 tras administración de 5 mg de tamoxifeno a E10.5.**



**Figura 48. Inmunohistoquímica para  $\beta$ -gal en órganos de animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Tie2}}$  y  $c\text{-Met}^{+/Δ}$ . Animales adultos tratados con tamoxifeno durante el desarrollo (5 mg a E10.5). Las barras de escala equivalen a 50  $\mu\text{m}$ .**

### 3.2 Inactivación de c-Met en el endotelio vascular de animales adultos

Adicionalmente se evaluó la importancia de la vía de señalización de HGF/c-Met en el endotelio vascular sanguíneo en animales adultos. Dado que en la edad adulta la mayoría de las células endoteliales son quiescentes, el análisis del rol de c-Met se realizó tras someter a los animales a diferentes desafíos de carácter fisiológico o patológico para inducir neovascularización.

#### 3.2.1 c-Met en neovascularización asociada a procesos fisiológicos: fertilidad, gestación y lactación

La mayoría de los escasos eventos fisiológicos en los que la neovascularización juega un papel relevante en los animales adultos están asociados a la fertilidad, la gestación y la lactación. Así pues, intensos procesos de angiogénesis tienen lugar durante el desarrollo folicular y la generación del cuerpo lúteo, la preparación del endometrio uterino para la implantación, la formación de la placenta y la galactogénesis (Clapp *et al.*, 2009; Groothuis, 2005). De todos ellos, la implantación y la placentación son los momentos en que ocurren los cambios fisiológicos más dramáticos en la vasculatura del tracto reproductivo. Por ello, el primer escenario en el que se evaluó la relevancia de c-Met en la función del endotelio vascular fue durante el establecimiento y progreso de la gestación.

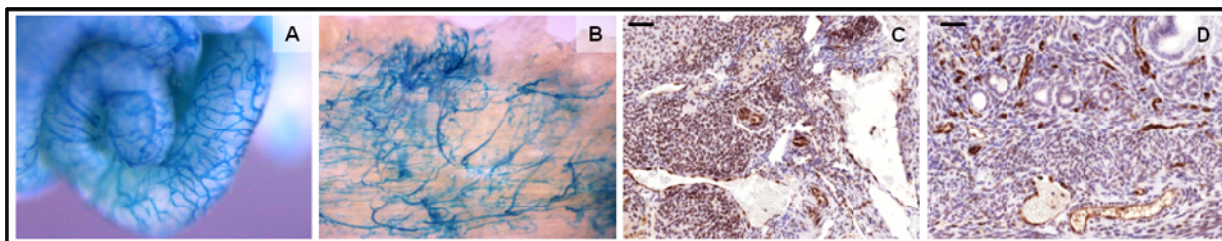
Para ello, hembras homocigotas para *Tie2*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> y homocigotas o heterocigotas para *c-Met*<sup>fl</sup> fueron tratadas con tamoxifeno durante ocho semanas consecutivas a partir del destete. Una vez completado el tratamiento con tamoxifeno las hembras recibieron dieta habitual durante cuatro semanas antes de ser puestas en cruce con machos de genotipo silvestre. A partir de dicho momento se registró la fecha de presentación de tapón vaginal de cada hembra y se realizó un seguimiento del progreso de la gestación. Una vez llegado el alumbramiento se registró la cantidad de crías nacidas en cada camada y la capacidad de las hembras para alimentar adecuadamente a sus crías. De esta manera, la comparación entre hembras *c-Met*<sup>ΔTie2</sup> y *c-Met*<sup>+/-Δ</sup> permite evaluar si la ausencia de la señalización de c-Met en el endotelio vascular sanguíneo compromete de alguna manera: a) la normalidad de la función ovárica durante el ciclo estral y la gestación (capacidad de ovulación y por tanto de concepción y formación del cuerpo lúteo para el mantenimiento de la gravidez); b) la correcta adecuación del endometrio a la implantación y placentación (progreso de la gestación y cantidad de crías nacidas vivas); y c) la eficiente producción de leche durante la lactación (crecimiento adecuado de las crías y supervivencia al destete).

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5 y evidencian que no existen diferencias estadísticamente significativas entre hembras *c-Met*<sup>ΔTie2</sup> y *c-Met*<sup>+/-Δ</sup> en ninguno de los parámetros

Genotipo de la madre	Crías nacidas	Crías destetadas
<i>c-Met</i> <sup>ΔTie2</sup> (n = 5)	25	22 (88.0%)
<i>c-Met</i> <sup>+/-Δ</sup> (n = 5)	28	26 (92.3%)

**Tabla 5. Capacidad de llevar a término la gestación y lactación por parte de hembras *c-Met*<sup>ΔTie2</sup> respecto a hembras *c-Met*<sup>+/-Δ</sup>.**

evaluados. Por su parte, la tinción X-gal o la inmunodetección de  $\beta$ -galactosidasa en ovario, útero y glándula mamaria (Figura 49) revela que la recombinación inducida en la vasculatura de dichos órganos afecta a la mayoría de las células endoteliales. Así pues, puede concluirse que la inactivación de c-Met en el endotelio vascular sanguíneo no es impedimento para la adecuada neovascularización fisiológica de los órganos reproductivos de la hembra durante la fecundación, gestación y lactación.



**Figura 49. Análisis de recombinación en la vasculatura del tracto reproductor de hembras *c-Met<sup>Tie2</sup>* tras administración de tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas. A. Tinción X-gal en preparación completa del infundíbulo. B. Tinción X-gal en preparación completa del endometrio uterino. C. Inmunohistoquímica para  $\beta$ -galactosidasa en el ovario. D. Inmunohistoquímica para  $\beta$ -galactosidasa en el endometrio uterino. Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m.**

### 3.2.2 c-Met en neovascularización inducida en procesos patológicos experimentales

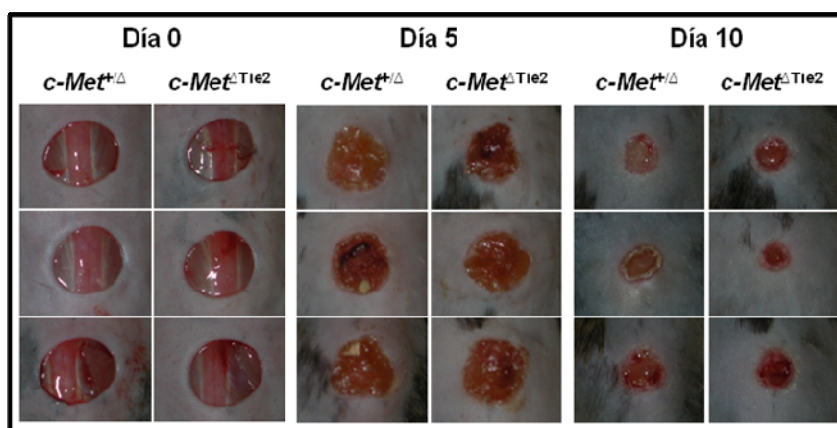
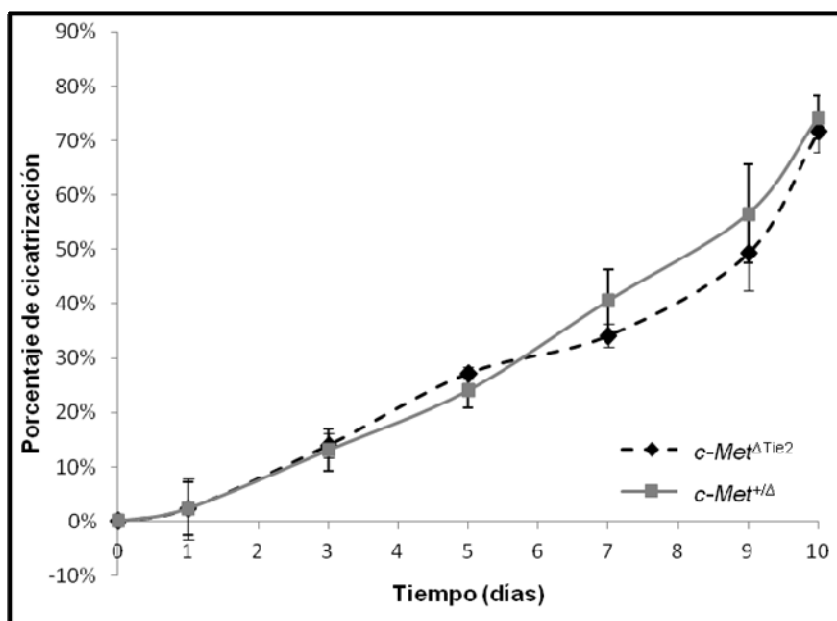
Una vez descartada la indispensabilidad de la señalización mediada por c-Met en el endotelio durante la angiogénesis fisiológica, se procedió a analizar su importancia en el control de la neovascularización asociada a eventos patológicos inducidos experimentalmente. De particular interés resulta su participación en la angiogénesis asociada a la regeneración tisular, la inflamación y la progresión tumoral.

#### 3.2.2.1 Relevancia de c-Met endotelial en la cicatrización de heridas

La cicatrización de heridas es un modelo comúnmente utilizado para el análisis de eventos asociados a la angiogénesis y para el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la formación y remodelación de estructuras vasculares (Eming *et al.*, 2007). Durante la regeneración tisular los brotes de los capilares angiogénicos invaden el coágulo rico en fibrina y fibronectina y en pocos días se organizan en una red microvascular a lo largo del tejido de granulación (Tonnesen *et al.*, 2000). Así pues, la angiogénesis juega un rol fundamental en la recuperación de la estructura y funcionalidad tisular. Tradicionalmente, la cicatrización de heridas se ha dividido para su estudio en tres fases: inflamatoria, proliferativa y de remodelación y en todas ellas los vasos sanguíneos y las células endoteliales juegan un papel relevante (Yamaguchi and Yoshikawa, 2001).

Con el objetivo de analizar la relevancia de la vía de señalización mediada por c-Met en las células endoteliales durante la neovascularización asociada a la cicatrización de heridas cutáneas, se procedió a generar heridas de escisión completa en ratones homocigotos para los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>*, *c-Met<sup>fl</sup>*, *Rosa26<sup>LSLlacZ</sup>* (*c-Met<sup>ΔTie2</sup>*) y hermanos de camada con igual genotipo pero heterocigotos para *c-Met<sup>fl</sup>* (*c-Met<sup>+/-</sup>*), todos ellos tratados con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas a partir del destete. Las





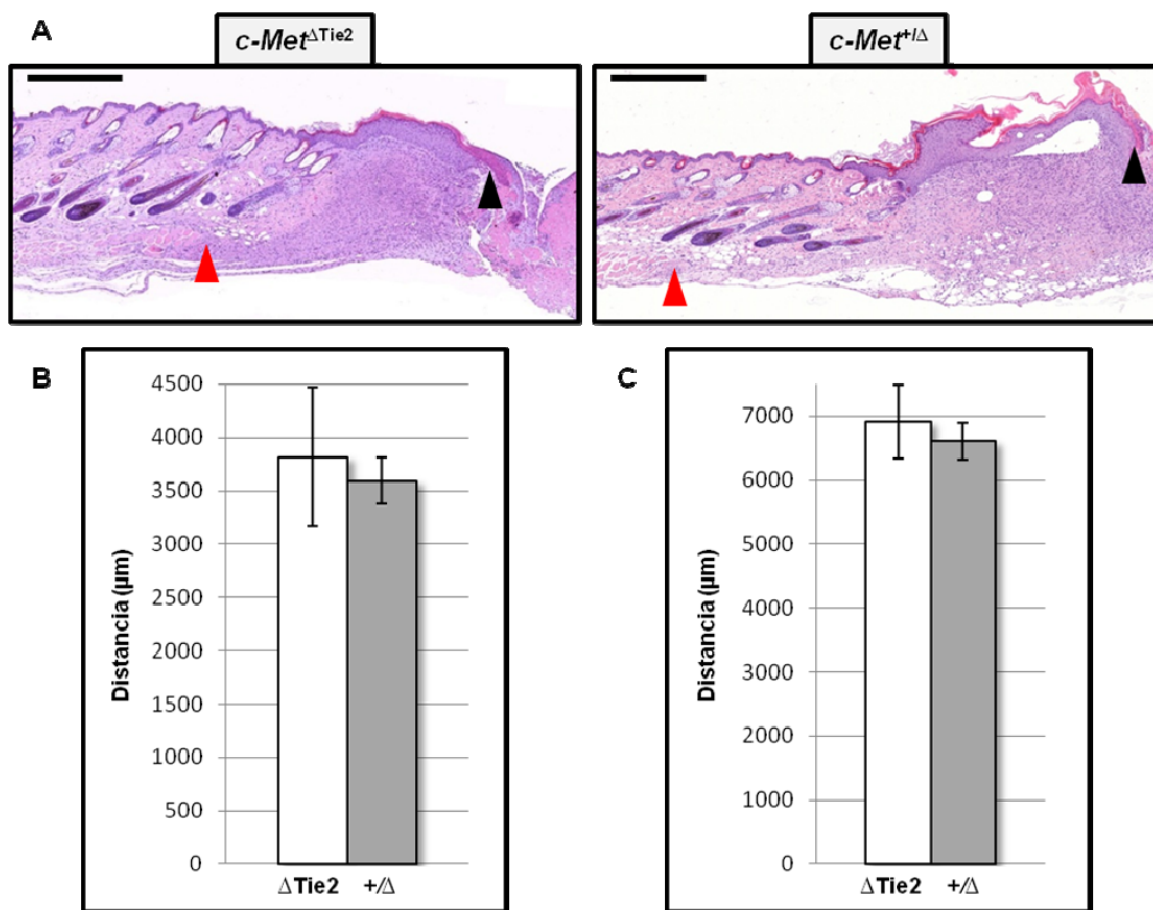
**Figura 50. Cinética de cicatrización en animales *c-Met<sup>ΔTie2</sup>* y *c-Met<sup>+/Δ</sup>*.** En el día 0 se realiza una herida de 8 mm de diámetro. En los días siguientes se mide el radio promedio de las heridas y se calcula el área ( $\pi r^2$ ) que permanece sin cicatrizar. A partir de la diferencia respecto al área de la herida a día 0 se calcula el porcentaje de cicatrización ( $\pm$ SEM). En el panel inferior se muestran imágenes representativas de las heridas a diferentes tiempos.

heridas, de ocho milímetros de diámetro, se realizaron en el dorso de los animales (día 0) y a partir de ese momento se monitorizó el tamaño de las heridas para definir la cinética del proceso de cicatrización (Figura 50). A pesar de existir ligeras diferencias en la cinética de cicatrización entre animales *c-Met<sup>ΔTie2</sup>* y *c-Met<sup>+/Δ</sup>* en ningún caso éstas son estadísticamente significativas; así pues, la velocidad de cicatrización no se ve afectada por la pérdida de la actividad de c-Met en las células endoteliales.

Diez días después de la generación de las heridas, los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de la piel con especial atención a la zona de cicatrización. Mediante análisis histológico de secciones teñidas con

hematoxilina y eosina (HE) se determinó el grado de cicatrización alcanzado en función de la re-epitelización de la herida y la recuperación de la integridad del panículo carnoso (capa subcutánea de musculatura estriada que se inserta en la dermis). En concordancia con los resultados obtenidos durante el análisis de la cinética de cicatrización, no se detectan diferencias estadísticamente significativas en el grado de re-epitelización ni en la distancia que separa ambos bordes del panículo carnoso (Figura 51).

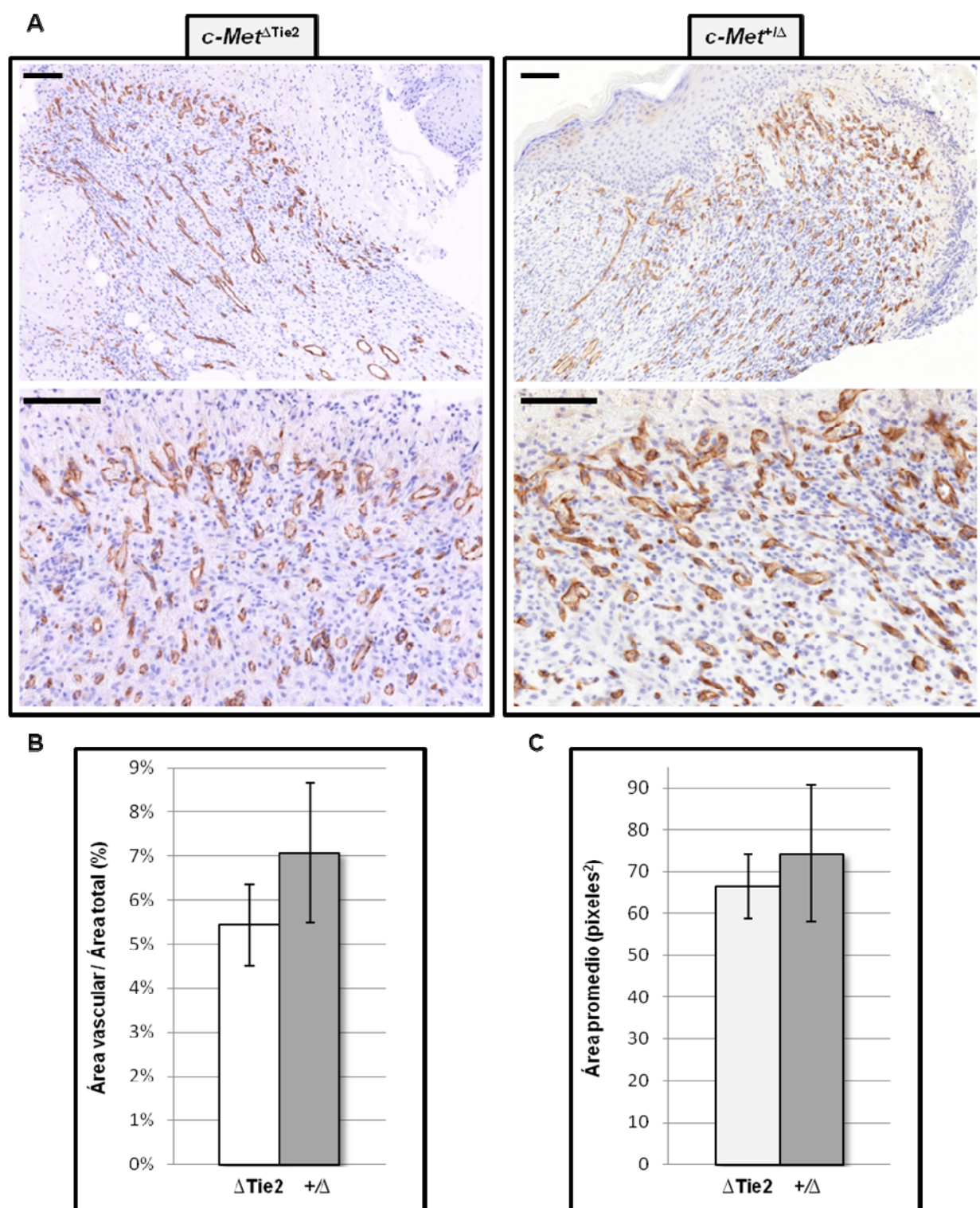
Dado que en nuestro modelo la ablación de la ruta de señalización de c-Met se limita exclusivamente al endotelio vascular sanguíneo, y que existen reportes previos que sugieren una función de dicho receptor en la regulación del crecimiento y la movilidad de las células endoteliales (Bussolino *et al.*, 1992; Ding *et al.*, 2003), el fenotipo más predecible en el proceso de cicatrización debería estar asociado a un cambio en la capacidad de neovascularización del endotelio. Para comprobar dicha



**Figura 51. Comparación del nivel de cicatrización en animales *c-Met<sup>ΔTie2</sup>* y *c-Met<sup>+/<sup>Δ</sup></sup>* diez días después de generadas las heridas (8 mm). A. Secciones teñidas con HE de uno de los márgenes de cicatrización de las heridas. Se indican los bordes de re-epitelización (cabeza de flecha negra) y del pániculo camoso (cabeza de flecha roja). Las barras de escala equivalen a 500 μm. B. Cuantificación de la distancia (μm) que separa los bordes de re-epitelización ( $\pm$ SEM) en heridas generadas en animales *c-Met<sup>ΔTie2</sup>* ( $\Delta$ Tie2) y *c-Met<sup>+/<sup>Δ</sup></sup>* (+/ $\Delta$ ),  $p=0.7528$ . C. Cuantificación de la distancia (μm) que separa los pániculos camosos ( $\pm$ SEM) en heridas generadas en animales *c-Met<sup>ΔTie2</sup>* ( $\Delta$ Tie2) y *c-Met<sup>+/<sup>Δ</sup></sup>* (+/ $\Delta$ ),  $p=0.6612$ .**

posibilidad, se analizó el grado de vascularización del tejido de granulación mediante inmunohistoquímica para CD31 (Figura 52 A) y se cuantificó la abundancia relativa de los vasos CD31<sup>+</sup> (Figura 52 B). Si bien existe una ligera diferencia en el grado de vascularización del tejido de granulación, siendo éste mayor en los animales *c-Met<sup>+/<sup>Δ</sup></sup>* (7.07 vs. 5.42%), la misma no es estadísticamente significativa ( $p=0.3938$ ). Adicionalmente se evaluó si existe diferencia en el tamaño de los vasos presentes en el tejido de granulación (Figura 52 C), sin embargo el área promedio individual de los vasos positivos para CD31 es indistinguible entre ratones *c-Met<sup>ΔTie2</sup>* y *c-Met<sup>+/<sup>Δ</sup></sup>* ( $p=0.6761$ ).

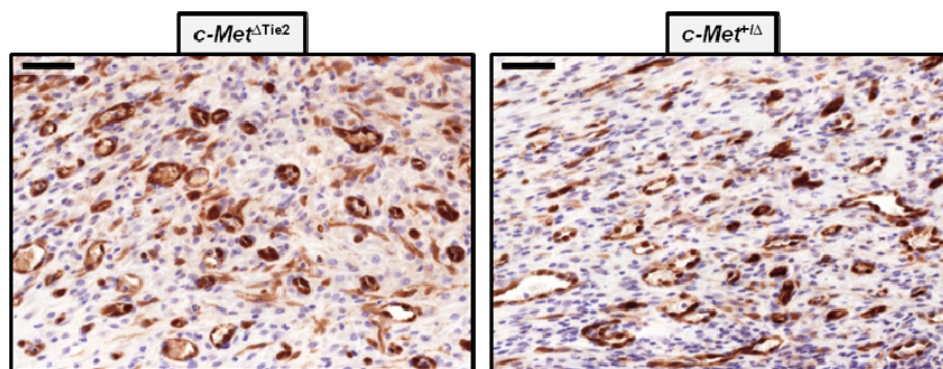
Finalmente, se evaluó el grado de recombinación del endotelio vascular en el tejido de granulación mediante inmunodetección de  $\beta$ -galactosidasa (Figura 53). En este caso cabría esperar que en los animales *c-Met<sup>ΔTie2</sup>* las células endoteliales positivas para  $\beta$ -galactosidasa contribuyesen en menor medida a la formación de nuevos vasos siempre que *c-Met* tuviera alguna relevancia en su capacidad proliferativa o migratoria. Sin embargo, la abundancia relativa de estructuras vasculares que expresan  $\beta$ -galactosidasa en el tejido de granulación es indistinguible entre ratones *c-Met<sup>ΔTie2</sup>* y *c-Met<sup>+/<sup>Δ</sup></sup>*. Así pues, puede concluirse que la ruta de señalización mediada por *c-Met* no es indispensable para la correcta neovascularización asociada al proceso de cicatrización de heridas en ratones adultos.



**Figura 52. Comparación del grado de vascularización del tejido de granulación en animales *c-Met* <sup>$\Delta$ Tie2</sup> y *c-Met*<sup>+/ $\Delta$</sup>  diez días después de generadas las heridas (8 mm). A. Inmunohistoquímica para CD31 en los bordes de cicatrización de las heridas. Las barras de escala equivalen a 100  $\mu$ m. B. Cuantificación del porcentaje que representa el área vascular CD31+ ( $\pm$ SEM) respecto al área total en el tejido de granulación de animales *c-Met* <sup>$\Delta$ Tie2</sup> ( $\Delta$ Tie2) y *c-Met*<sup>+/ $\Delta$</sup>  (+/ $\Delta$ ),  $p=0.3938$ . C. Cuantificación del área promedio (píxeles<sup>2</sup>) de los vasos CD31+ ( $\pm$ SEM) presentes en el tejido de granulación de animales *c-Met* <sup>$\Delta$ Tie2</sup> ( $\Delta$ Tie2) y *c-Met*<sup>+/ $\Delta$</sup>  (+/ $\Delta$ ),  $p=0.6761$ .**



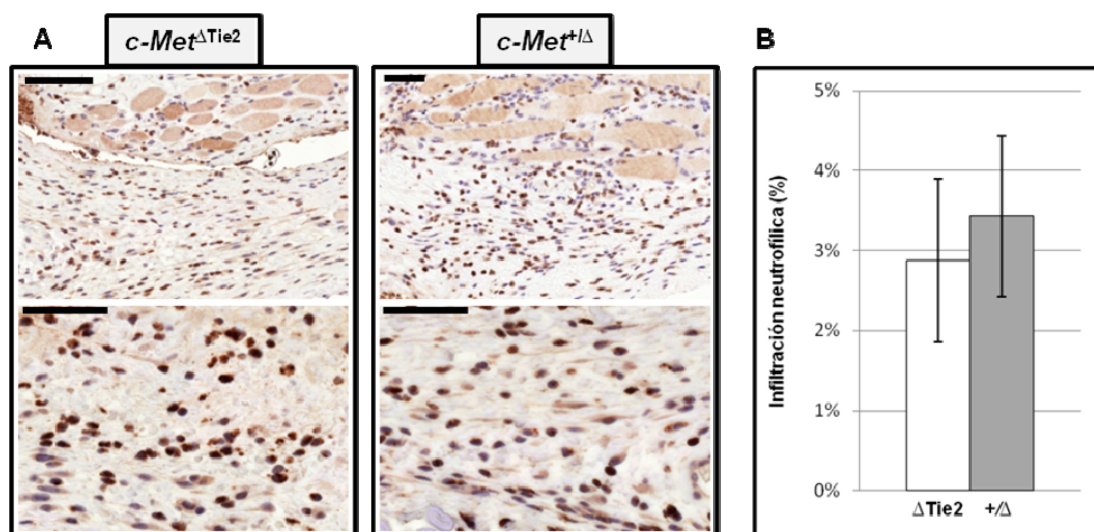
Durante la cicatrización de heridas, la movilización e infiltración de células inflamatorias juega un papel relevante en la producción de citoquinas y la modulación del proceso de regeneración tisular



**Figura 53. Análisis de la presencia de células endoteliales recombinadas ( $\beta$ -gal+) en la vasculatura del tejido de granulación de animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Tie}2}$  y  $c\text{-Met}^{+/Δ}$ . Inmunohistoquímica para  $\beta$ -galactosidasa en el tejido de granulación de heridas (8 mm) tras diez días de cicatrización. Las barras de escala equivalen a 50  $\mu\text{m}$ .**

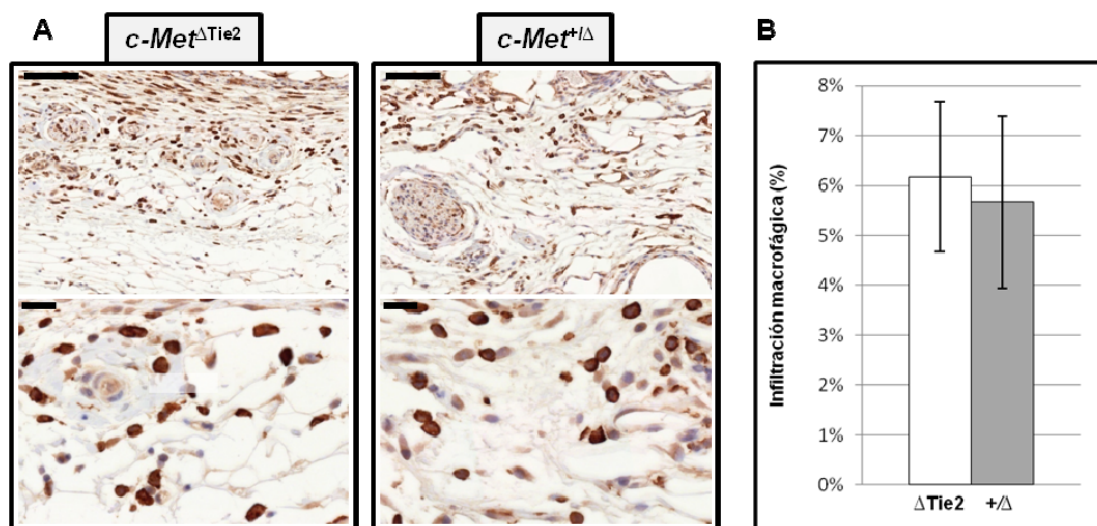
(Lingen, 2001). Dado que las células endoteliales participan activamente en el reclutamiento y extravasación de células inflamatorias (Cook-Mills and Deem, 2005) y que existen evidencias que apuntan a la contribución de c-Met en el control de las funciones de barrera del endotelio vascular (Liu *et al.*, 2002) se procedió a analizar si existían diferencias en la infiltración de células inflamatorias durante la cicatrización de heridas en animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Tie}2}$  y  $c\text{-Met}^{+/Δ}$ .

Para ello se realizaron heridas de cuatro milímetros de diámetro en el dorso de ratones de los genotipos antes indicados y sometidos a tratamiento con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas. Un primer grupo de animales fue sacrificado dos días después de realizar las heridas, momento en el que la infiltración de neutrófilos alcanza valores máximos (Tomlinson and Ferguson, 2003). La identificación de los neutrófilos en las secciones tisulares se realizó mediante inmunodetección con anticuerpo anti-mieloperoxidasa (MPO) y a partir de ellas se cuantificó el grado de infiltración neutrofílica (Figura 54). Los resultados obtenidos sugieren una ligera diferencia en la infiltración neutrofílica siendo esta menor en los ratones  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Tie}2}$ , sin embargo la misma no resulta estadísticamente significativa ( $p=0.7160$ ).



**Figura 54. Infiltración de neutrófilos en el tejido de granulación de heridas cutáneas en animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Tie}2}$  y  $c\text{-Met}^{+/Δ}$ . A. Inmunohistoquímica para MPO en el tejido de granulación de heridas (4 mm) tras dos días de cicatrización. Las barras de escala equivalen a 50  $\mu\text{m}$ . B. Cuantificación porcentual del área que representan los neutrófilos MPO+ ( $\pm\text{SEM}$ ) respecto al área total del tejido de granulación en animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Tie}2}$  ( $\Delta\text{Tie}2$ ) y  $c\text{-Met}^{+/Δ}$  ( $+/Δ$ ),  $p=0.7160$ .**

Adicionalmente, otro grupo de ratones fue sacrificado cinco días después de realizar las heridas, momento en el que la infiltración de macrófagos alcanza valores máximos (Tomlinson and Ferguson, 2003). La identificación de los macrófagos en las secciones tisulares se realizó mediante inmunodetección con el factor F4/80 (Figura 55). Las diferencias en el porcentaje que representa el área ocupada por macrófagos positivos para F4/80 respecto al área total del tejido de granulación no son estadísticamente significativas por lo que puede concluirse que la señalización mediada por c-Met en el endotelio vascular no juega un papel indispensable en la regulación del reclutamiento y extravasación de dicha población celular en el contexto de la cicatrización y regeneración tisular.



### 3.2.2.2 Relevancia de c-Met endotelial en la reacción de hipersensibilidad por contacto

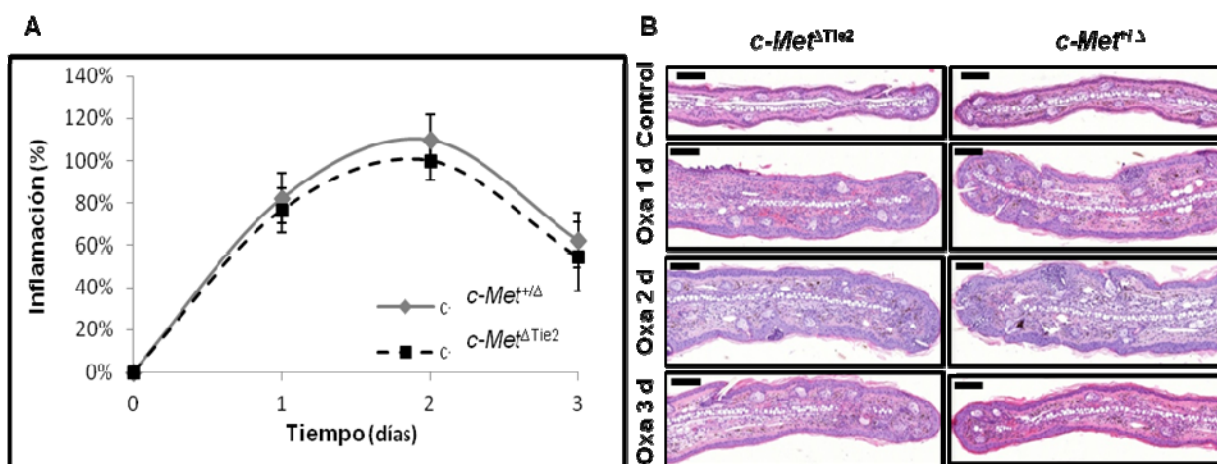
La reacción retardada de hipersensibilidad por contacto es un modelo comúnmente utilizado para el estudio de enfermedades inflamatorias crónicas ya que, al igual que éstas, es iniciada por la presencia de un antígeno y se perpetúa en el tiempo mediante la acción de células T con reactividad específica para dicho antígeno (Staite *et al.*, 1996). El mecanismo de la reacción de hipersensibilidad por contacto comprende dos fases distintas: sensibilización y desencadenamiento o elicitación. Durante la primera el alérgeno inactivo (hapteno) se une covalentemente a proteínas de la piel y forman un complejo que es presentado a las células T por medio de las células dendríticas. El desencadenamiento se da tras una segunda presentación del hapteno que induce la activación específica de los linfocitos T de memoria y su reclutamiento al sitio de contacto (Keough *et al.*, 2010). A continuación, las células T producen citoquinas proinflamatorias como TNF-α, IFN-γ, IL-1 e IL-6 que dirigen el reclutamiento de células de linaje mieloide, fundamentalmente neutrófilos y macrófagos, cuya infiltración alcanza cotas máximas 24-48 horas después de desencadenada la reacción (Xu *et al.*, 1996).

Por otra parte, HGF, el único ligando conocido del receptor c-Met, ha sido asociado a la adhesión y migración de células T en los tejidos, proceso que depende de una cascada de interacciones con el endotelio; en particular, HGF induce la migración preferencial de linfocitos T de memoria (Adams *et al.*, 1994). Así pues, resulta interesante analizar si existe algún defecto en la respuesta inflamatoria inducida mediante una reacción de hipersensibilidad por contacto en animales que carecen de la vía de señalización mediada por c-Met específicamente en el endotelio vascular.

Para ello ratones homocigotos para los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup>, *c-Met*<sup>fl</sup>, *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> (*c-Met*<sup>ΔTie2</sup>) y hermanos de camada heterocigotos para *c-Met*<sup>fl</sup> (*c-Met*<sup>+/-Δ</sup>), todos ellos tratados con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas a partir del destete, recibieron una aplicación tópica de 50 μL de oxazolona al 2% en el abdomen (sensibilización). El desencadenamiento de la reacción de hipersensibilidad se realizó seis días después, mediante aplicación tópica de 20 μL de oxazolona al 1% en las caras interna y externa de la oreja izquierda de cada animal, mientras que en la oreja derecha (control negativo) se aplicó únicamente el vehículo.

Inicialmente se evaluó el grado de inflamación inducido (%) en los tres días siguientes a la segunda aplicación de oxazolona mediante medición del grosor de la oreja y comparación con el grosor antes de la inducción (Figura 56 A). En ambos genotipos estudiados el punto máximo de inflamación se alcanza 48 horas después de iniciado el proceso y la resolución del mismo comienza a las 72 horas. Los resultados obtenidos no reflejan ninguna diferencia sustancial en el porcentaje de inflamación desencadenado entre ratones *c-Met*<sup>ΔTie2</sup> y *c-Met*<sup>+/-Δ</sup>. Adicionalmente, mediante análisis histológico de secciones de las orejas a diferentes tiempos se comprueba que no existen diferencias cualitativas reseñables en la apariencia general de las mismas (Figura 56 B).

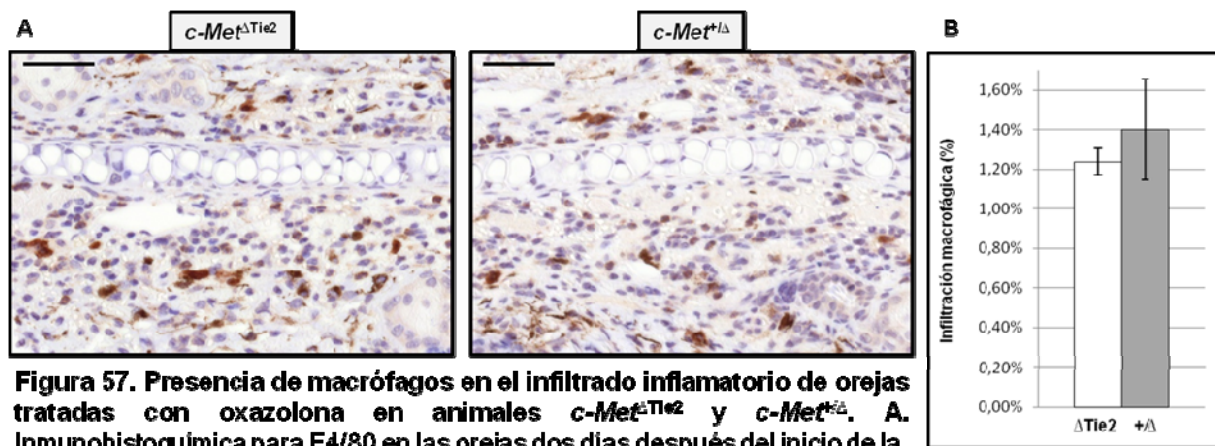
A continuación se analizó la abundancia de macrófagos en el infiltrado inflamatorio en el punto máximo de inflamación (48 horas tras la aplicación de oxazolona) mediante inmunodetección con el



**Figura 56. Análisis de la inflamación inducida mediante reacción de hipersensibilidad por contacto en animales *c-Met*<sup>ΔTie2</sup> y *c-Met*<sup>+/-Δ</sup>.** A. Cinética de la reacción inflamatoria a lo largo de los tres días posteriores al desencadenamiento del proceso inflamatorio. Se muestran valores promedio para cada genotipo (±SEM). B. Secciones teñidas con HE de las orejas tratadas con oxazolona (oxa) o vehículo (control) a diferentes tiempos tras la inducción de la respuesta inflamatoria. Las barras de escala equivalen a 100 μm.



factor F4/80 (Figura 57 A) y se cuantificó el porcentaje que representan los mismos respecto al área total (Figura 57 B). Los resultados obtenidos reflejan que no existen diferencias estadísticamente significativas en la infiltración macrófagica durante la reacción de hipersensibilidad por contacto. Dado que, tanto la respuesta inflamatoria como la infiltración de macrófagos depende en primera instancia del reclutamiento y activación de células T de memoria, los resultados obtenidos sugieren que la ruta de señalización mediada por c-Met en las células endoteliales no es fundamental en la regulación de la respuesta de estas células ni en los mecanismos ulteriores que determinan el nivel de inflamación y la extravasación de células inflamatorias de linaje mieloide.



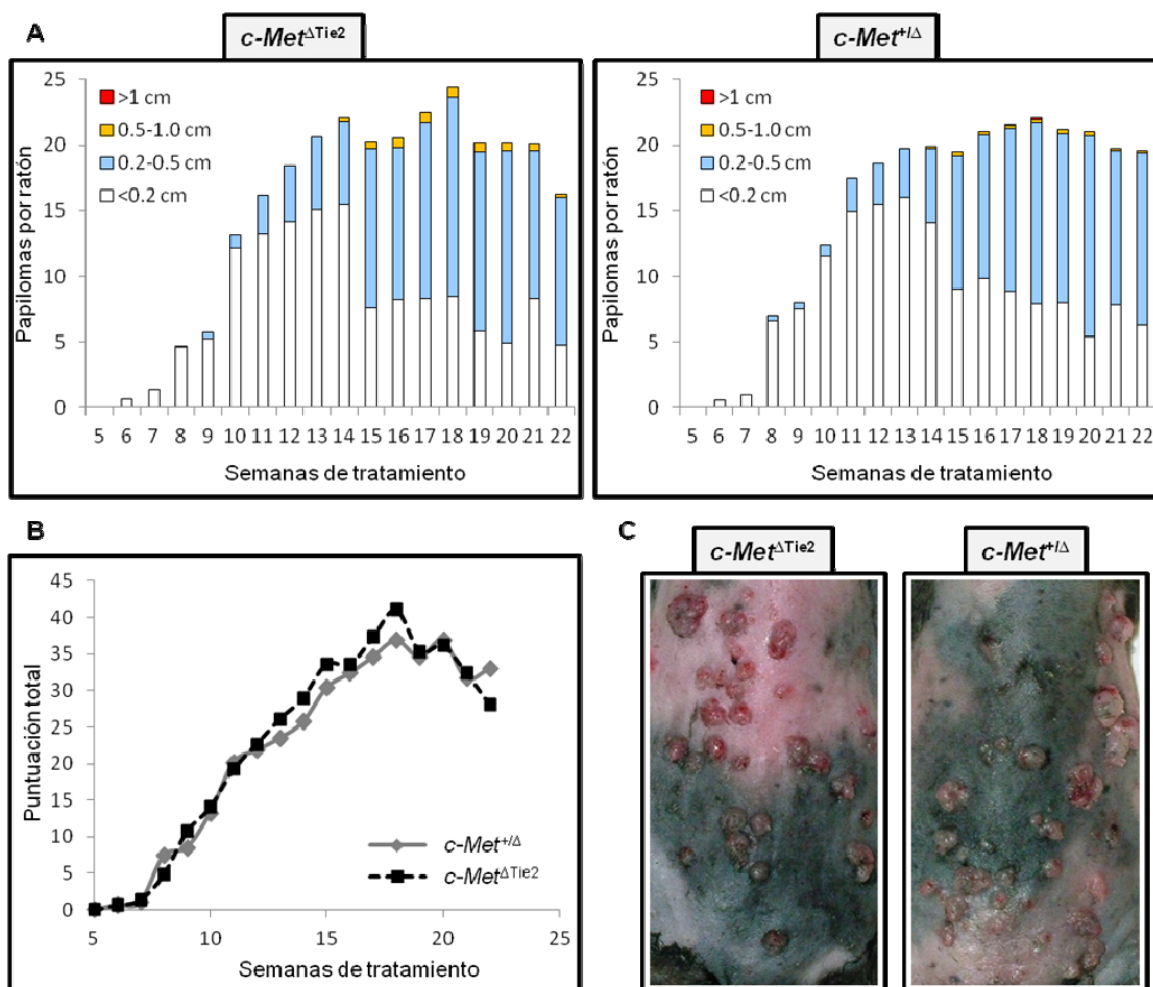
### 3.2.2.3 Relevancia de c-Met endotelial en un modelo de carcinogénesis de piel

La relevancia de c-Met en el desarrollo del cáncer y la invasión metastásica ha sido ampliamente documentada en la literatura científica (Boccaccio and Comoglio, 2006; Gentile *et al.*, 2008; Lesko and Majka, 2008; Ma *et al.*, 2008); adicionalmente, varias publicaciones hacen referencia a su participación directa en el control de la angiogénesis tumoral (Dong *et al.*, 2004; Gotte *et al.*, 2007; Kuhnén *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). De hecho, se han desarrollado potenciales fármacos que mediante la inhibición de la señalización a través del eje HGF/c-Met consiguen disminuir el crecimiento tumoral a través de la regulación de la neovascularización del tumor, entre otros procesos (Liu *et al.*, 2010; Puri *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; You and McDonald, 2008). Por otra parte, c-Met ha sido asociado a mecanismos de resistencia a inhibidores de mediadores celulares que constituyen dianas de interés en el tratamiento del cáncer (Nakachi *et al.*, 2010; Shojaei *et al.*, 2010). Así pues, la vía de señalización mediada por c-Met constituye un sistema de control morfogénico de gran interés en la patogenia carcinogénica y en particular en la neovascularización tumoral, por lo que estudiar sus funciones específicas en el endotelio vascular durante el proceso de carcinogénesis resulta de suma importancia.

Con el objetivo de abordar la relevancia de la ruta de señalización mediada por c-Met en el endotelio vascular en el contexto del desarrollo y progresión tumoral, animales homocigotos para los

alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup>, *c-Met*<sup>fl</sup>, *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> (*c-Met*<sup>ΔTie2</sup>) y hermanos de camada heterocigotos para *c-Met*<sup>fl</sup> (*c-Met*<sup>+/-</sup>), todos ellos tratados con tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas a partir del destete, fueron sometidos a un protocolo de carcinogénesis química inducido por tratamiento tópico con DMBA/TPA. Dicho modelo experimental ha sido ampliamente utilizado para el estudio secuencial de la iniciación, promoción y progresión tumoral en la piel del ratón. Se basa en la aplicación tópica de un agente mutágeno (7,12 dimetilbenzo[a]antraceno, DMBA) seguido por la aplicación repetida de un agente promotor (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, TPA) que resulta en la formación de múltiples tumores benignos denominados papilomas, de los cuales el 5-10% sufren conversión maligna a carcinomas que posteriormente tienen la capacidad de convertirse en tumores más agresivos que deriven en metástasis (Curran, 2001).

El análisis de la progresión tumoral en ratones *c-Met*<sup>ΔTie2</sup> y *c-Met*<sup>+/-</sup> (Figura 58 A) evidencia que no existen diferencias estadísticamente significativas en el número de papilomas o en el tamaño de los mismos a lo largo de las 22 semanas de tratamiento. Un análisis conjunto de ambas variables, mediante la asignación de un sistema de puntuación basado en el tamaño de las lesiones (Figura 58 B y apartado 3.2.3 de Materiales y Métodos), refleja que en ambos genotipos la progresión tumoral sigue una cinética



**Figura 58. Progresión tumoral en ratones *c-Met*<sup>ΔTie2</sup> y *c-Met*<sup>+/-</sup> en un modelo de carcinogénesis química basado en la aplicación tópica de DMBA/TPA. A. Cantidad y tamaño de los papilomas formados a lo largo de las 22 semanas de tratamiento. B. Análisis de la progresión tumoral en función del sistema de puntuación asignada (ver apartado 3.2.3 de Materiales y Métodos). C. Imagen de los papilomas formados en ratones representativos de cada genotipo (semana 20 de tratamiento).**

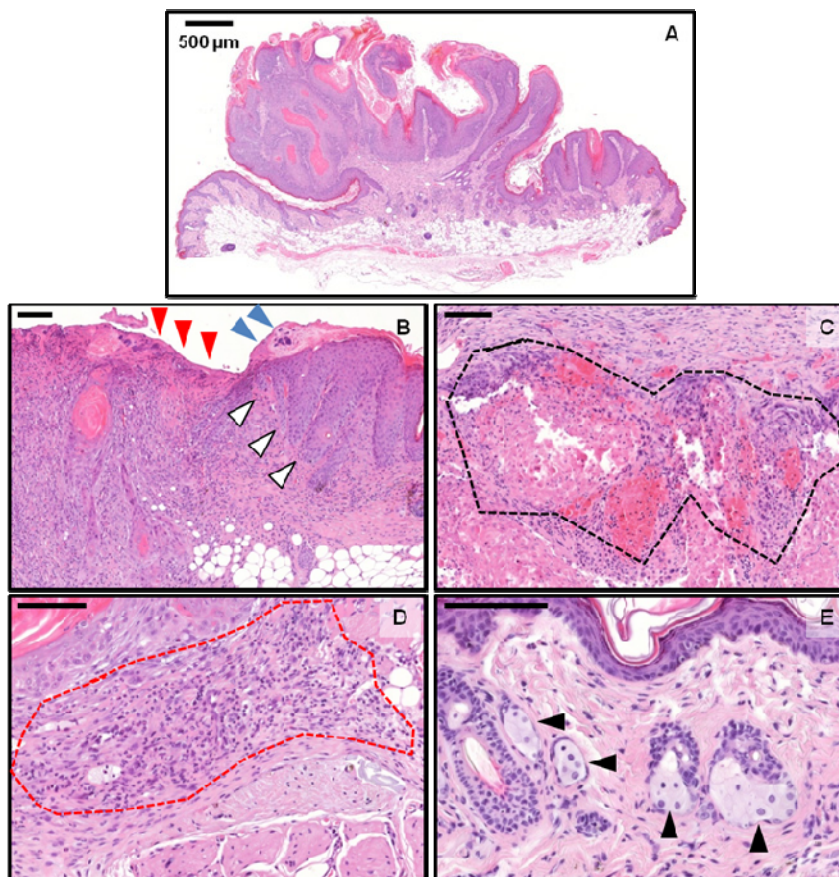


similar, sin diferencias reseñables. Igualmente, la inspección macroscópica de las lesiones (Figura 58 C) no permite identificar diferencias sustanciales en su aspecto general. El ensayo tuvo que ser interrumpido en la semana 22 de tratamiento debido a criterios humanitarios de punto final asociados a la mala condición general de numerosos animales de ambos genotipos.

Tras el sacrificio de los animales se tomaron muestras de las lesiones más representativas de cada animal y se procesaron para su análisis histológico. La inspección microscópica de las mismas permite concluir que no existen diferencias significativas entre los genotipos y que la

progresión maligna (conversión a carcinomas epidermoides microinfiltrantes) se limita a un 2.22% de los animales de genotipo *c-Met*<sup>+/-</sup> y al 3% de aquellos de genotipo *c-Met*<sup>ΔTie2</sup>. En sentido general las lesiones se caracterizan por presentar hiperplasia epitelial con hiperqueratosis, es frecuente la aparición de ulceraciones e inflamación de la dermis así como el desarrollo de hiperplasia de las glándulas sebáceas y necrosis en capa basal de la dermis (Figura 59).

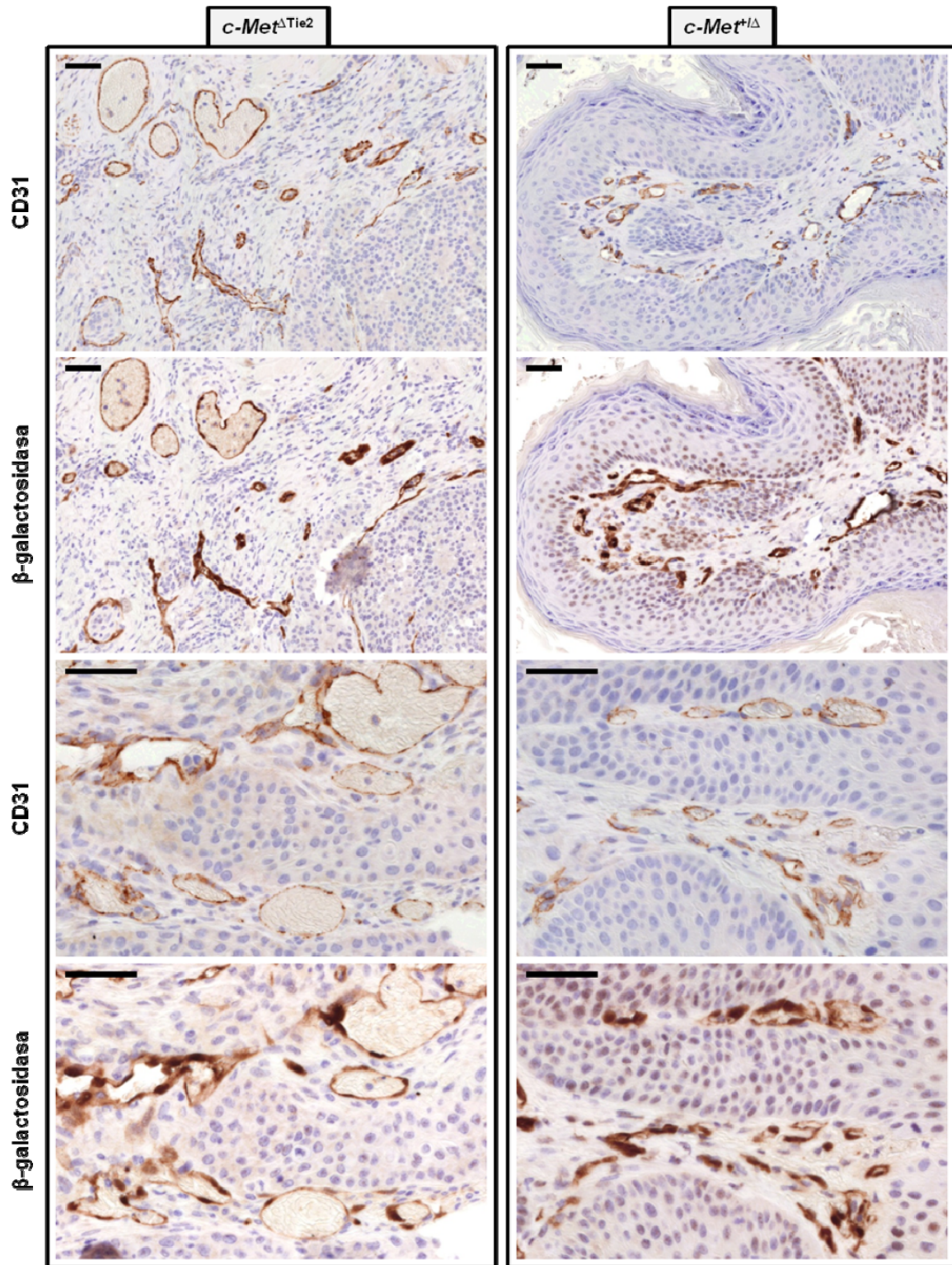
Por otra parte, la inspección histológica de las lesiones tumorales sugiere que el grado de vascularización de las mismas es muy similar entre animales *c-Met*<sup>ΔTie2</sup> y *c-Met*<sup>+/-</sup>. De hecho, la estrecha similitud en la prevalencia y capacidad de crecimiento de los papilomas en ratones de ambos genotipos, sugiere que no existen defectos relevantes en el aporte nutricional asociado al desarrollo de la vasculatura tumoral. Con el objetivo de constatar que en los animales *c-Met*<sup>ΔTie2</sup> las células endoteliales recombinadas son capaces de contribuir efectivamente al desarrollo de la vasculatura tumoral, se procedió a comparar secciones consecutivas de lesiones tumorales mediante inmunodetección de CD31 y β-galactosidasa. Los resultados obtenidos (Figura 60) evidencian que prácticamente todas las células positivas para CD31 expresan altos niveles de β-galactosidasa en los dos genotipos estudiados. Así



**Figura 59. Análisis histológico de las lesiones tumorales generadas en ratones sometidos a carcinogénesis química mediante aplicación tópica de DMBA/TPA. Secciones teñidas con HE. A. Apariencia típica de un papiloma. B. Zonas de hiperplasia epitelial (cabezas de flecha blancas), hiperqueratosis (azules), ulceración (rojas). C. Área de necrosis tisular (delimitada por línea punteada). D. Infiltración inflamatoria (área delimitada por línea punteada). E. Hiperplasia de glándulas sebáceas (cabezas de flecha). Las barras de escala equivalen a 100 μm.**



pues, puede concluirse que la ablación de la actividad de c-Met en el endotelio vascular no impide la contribución de las células endoteliales a la neovascularización tumoral en el marco de un modelo de carcinogénesis química inducido por DMBA/TPA.



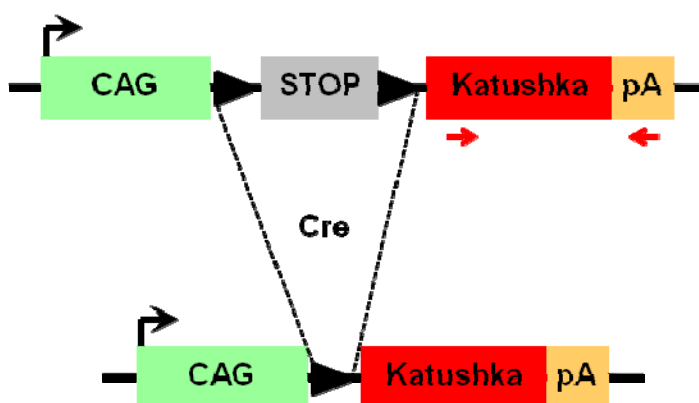
**Figura 60.** Análisis de la contribución del endotelio vascular recombinado ( $\beta$ -gal +) a la neovascularización tumoral en ratones  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Tie2}}$  y  $c\text{-Met}^{+/Δ}$  en un modelo de carcinogénesis química basado en la aplicación tópica de DMBA/TPA. Inmunohistoquímica para  $\beta$ -galactosidasa y CD31 en secciones consecutivas de papilomas cutáneos. Las barras de escala equivalen a 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4. Generación de un modelo trazador de la actividad de Cre basado en la expresión de la proteína roja fluorescente Katushka (Tg.CAG-LSL-Katushka)

Una segunda parte de este trabajo consiste en la generación y caracterización de una línea trazadora de la actividad de Cre para la monitorización de eventos de recombinación mediante técnicas de imagen molecular, que suponga una mejora respecto a otras líneas ya existentes. En el contexto de la recombinación mediada por Cre en la vasculatura (inducida por el modelo *Tie2<sup>CreERT2</sup>*) esta línea debería permitir la visualización de los vasos sanguíneos mediante técnicas de adquisición de fluorescencia; dicho criterio es extrapolable a otros modelos de expresión ubicua o tejido-específica de la recombinasa Cre. Katushka es una proteína fluorescente con emisión en el rojo lejano generada mediante mutagénesis a partir de una proteína fluorescente de la anémona de mar *Entacmaea quadricolor* (Shcherbo *et al.*, 2007). Se caracteriza por ser una de las proteínas fluorescentes más brillantes con emisión de fluorescencia superior a 620 nm y por ello es una de las proteínas mas apropiadas para la visualización de procesos biológicos *in vivo* (Deliolani *et al.*, 2008). Es importante destacar que este modelo trazador constituye el primer modelo murino transgénico con expresión de Katushka.

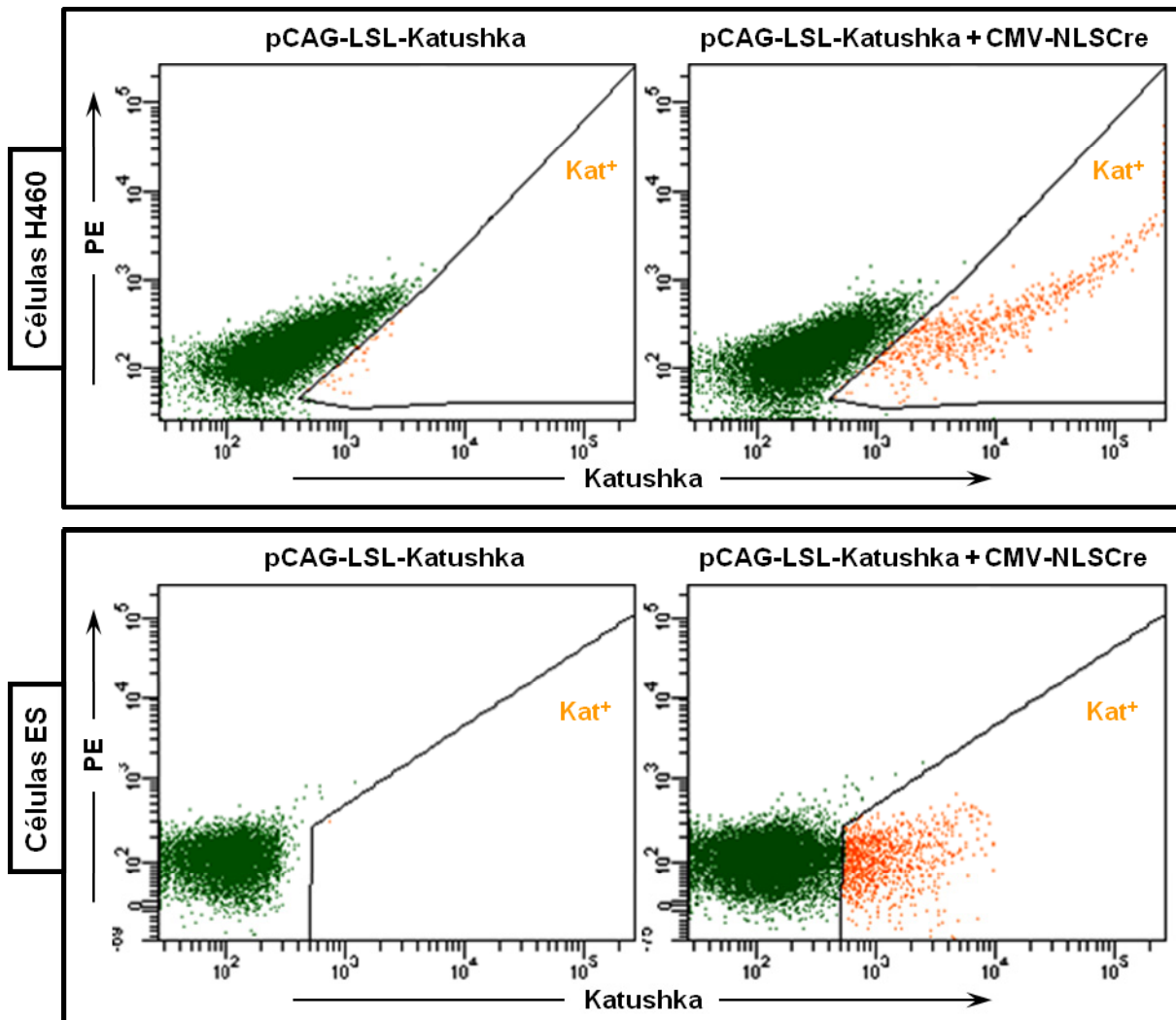
##### 4.1 Construcción del transgén y validación *in vitro*

El primer paso para la generación de esta nueva línea trazadora de la actividad de Cre consistió en la construcción de un ADN plasmídico (pCAG-LSL-Katushka) portador del transgén (Dieguez-Hurtado *et al.*, 2011). El transgén está conformado por el promotor híbrido CAG, compuesto a su vez por la secuencia potenciadora inmediata temprana (*immediate early enhancer sequence*) de citomegalovirus y el promotor modificado de la  $\beta$ -actina de pollo (Niwa *et al.*, 1991), una secuencia de parada de transcripción (secuencia *STOP*) flanqueada por sitios *loxP*, y justo a continuación la secuencia codificante de la proteína fluorescente Katushka y la señal de poliadenilación de la  $\beta$ -globina de conejo. Así pues, en esta construcción la expresión de Katushka es dirigida por el promotor ubicuo CAG siempre y cuando la secuencia de parada de transcripción sea eliminada mediante recombinación dependiente de Cre (Figura 61).



**Figura 61. Estructura del transgén.** El transgén está formado por el promotor híbrido CAG, una secuencia de parada de transcripción (*STOP*) flanqueada por sitios *loxP* (triángulos negros), el cDNA de Katushka y una señal de poliadenilación (pA). Con flechas rojas se señala el sitio de hibridación de los oligonucleótidos utilizados para el genotipado. La recombinación mediada por Cre escinde la secuencia *STOP* y permite que el promotor CAG dirija la expresión de Katushka.

La primera evaluación de la expresión de Katushka a partir de esta construcción se realizó *in vitro* mediante la transfección del plásmido portador de la misma en dos tipos celulares distintos: células ES de ratón y células H460 de carcinoma de pulmón. El plásmido se co-transfectó con el vector CMV-NLSCre (que dirige la expresión constitutiva de la recombinasa Cre precedida de una secuencia de localización nuclear). Como control se utilizaron células transfectadas únicamente con el ADN plasmídico portador del alelo trazador de la actividad de Cre. Mediante análisis por citometría de flujo se determinó que ninguna de las células transfectadas exclusivamente con el plásmido pCAG-LSL-Katushka expresaba niveles detectables de la proteína fluorescente roja. Por su parte, tanto en las células ES como en las H460 co-transfectadas con ambos vectores, fue posible detectar poblaciones celulares positivas para la expresión de Katushka, lo que confirma el carácter ubicuo del promotor CAG y la dependencia del sistema a la actividad de la recombinasa Cre (Figura 62).



**Figura 62. Evaluación *in vitro* del transgén trazador de la actividad de Cre CAG-LSL-Katushka.** Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de Katushka en células co-transfectadas con el plásmido trazador pCAG-LSL-Katushka y el vector CMV-NLSCre. En ausencia de la recombinasa Cre no es detectable la expresión de Katushka.



## 4.2 Generación de ratones transgénicos

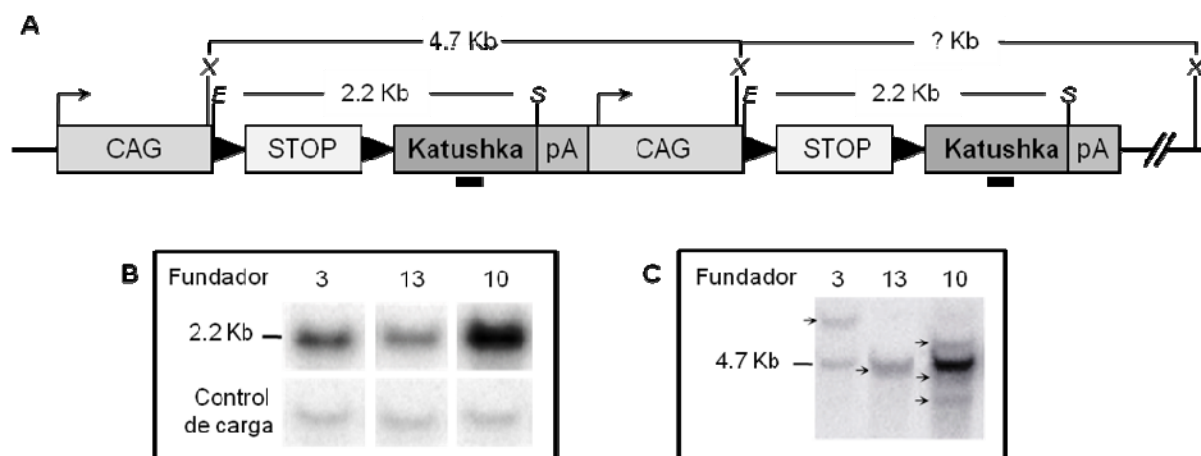
Tras haber validado *in vitro* que Katushka se expresa eficientemente en células eucariotas y que su expresión es estrictamente dependiente de la recombinación mediada por Cre, se procedió a generar ratones transgénicos mediante la inyección del transgén en el pronúcleo de oocitos fertilizados (ver apartado 4.1 de Materiales y Métodos). Los oocitos inyectados se transfirieron a hembras receptoras que llevaron la gestación a término y dieron a luz camadas en las que se detectó la existencia de seis animales transgénicos mediante genotipado por PCR (Tabla 6). Dichos ratones constituyen los fundadores potenciales de la línea transgénica, sin embargo cada uno de ellos puede tener un número variable de copias del transgén, distintos sitios de integración del mismo y/o diferencias en el número de eventos de integración, así como diverso grado de mosaicismo. Todas estas variables pueden afectar al patrón de expresión de Katushka o a la eficiencia de la recombinación mediada por Cre.

Concentración ADN	Hembras donadoras	Cigotos inyectados	Cigotos transferidos	Hembras receptoras	Crias nacidas	Número de transgénicos
1 ng/ $\mu$ L	10	110	100	2	2+1=3	1
1 ng/ $\mu$ L (1:4)	14	92	85	2	2+2-1=2	1
1 ng/ $\mu$ L (1:2)	14	210	189	4	5+4+1+1-1=10	3
1 ng/ $\mu$ L (1:2)	14	69	50	4	4+1+3+2-1=9	1

**Tabla 6. Generación de ratones transgénicos por microinyección de ADN.** Tras 4 sesiones de microinyección del transgén se obtuvieron 6 animales fundadores potenciales identificados mediante genotipado por PCR con los oligonucleótidos representados en la figura FXXINT4.

## 4.3 Caracterización de la integración del transgén y análisis de la transmisión en línea germinal

De los seis ratones generados portadores del transgén, únicamente tres fundadores (No. 3, 10 y 13) portaban el alelo transgénico en la línea germinal, siendo capaces de transmitirlo a su descendencia. Mediante *Southern Blot* (ver apartado 4.3 de Materiales y Métodos y Figura 63 A) se realizó un análisis de la cantidad de copias del transgén integradas en tándem (Figura 63 B) y del número de eventos de integración (Figura 63 C) en cada fundador. Así pues, se estableció que todos los fundadores poseían dos o más copias del transgén integradas en tándem y dos de ellos presentaban eventos únicos de integración. La presencia de más de un evento de integración puede inducir modificaciones en el patrón de expresión a lo largo de distintas generaciones, debido a posibles efectos de segregación durante la recombinación cromosómica; por ello se decidió continuar la caracterización de aquellos fundadores con un único evento de integración. En esta tesis se detalla la caracterización de la línea establecida a partir del fundador No.3.



**Figura 63. Análisis por Southern Blot del número de copias y eventos de integración del transgén a partir de ADN genómico de biopsias de cola.** A. Representación esquemática de un evento de integración de dos copias en tándem. Se indican los sitios de restricción para *XbaI* (X), *EcoRI* (E) y *SacI* (S). La sonda genómica utilizada (rectángulo negro), que reconoce el cDNA de Katushka, y el tamaño de los fragmentos esperados en cada análisis. B. Análisis del número relativo de copias integradas mediante doble digestión con *EcoRI*-*SacI*. La sonda reconoce un fragmento interno de 2.2 Kb y la intensidad de la banda es proporcional al número de copias integradas. Como control de carga se utilizó una sonda que reconoce el locus *Tie2*. C. Análisis del número de eventos de integración mediante digestión con *XbaI*. La integración de varias copias en tándem con orientación cabeza-cola da lugar a una banda de 4.7 Kb. La ocurrencia de eventos múltiples de integración se detecta por la presencia de más de una banda adicional (marcadas con flechas negras).

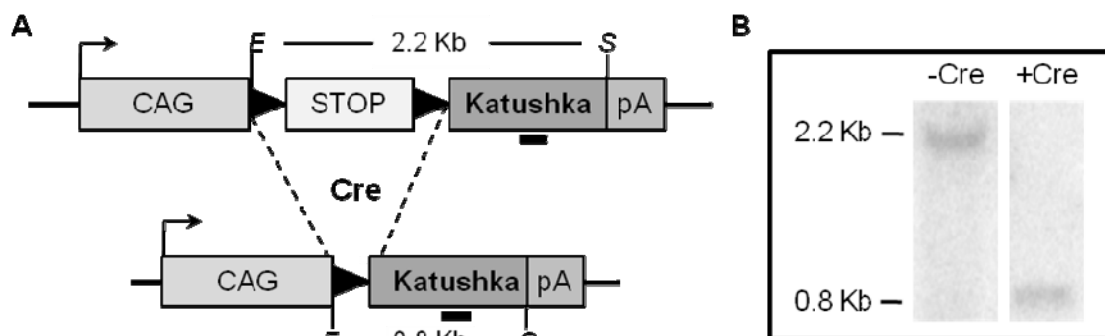
Para el establecimiento de la línea, el ratón fundador se cruzó con animales de genotipo silvestre y fondo genético C57BL/6J-Tyr<sup>(C-2J)/J</sup>. La descendencia fue genotipada por PCR (ver apartado 4.2 de Materiales y Métodos) mediante oligonucleótidos que reconocen la secuencia de Katushka y la señal de poliadenilación. La transmisión del transgén se rige por las reglas de herencia mendelianas y su presencia en ningún caso genera alteraciones detectables.

## 5. Caracterización del modelo Tg.CAG-LSL-Katushka

### 5.1 Cruce con un modelo inductor de recombinación ubicua

El primer elemento de la caracterización consistió en comprobar si, *in vivo*, la recombinación mediada por Cre y la consiguiente expresión de Katushka es eficiente en todos los tipos celulares. Además, dado que éste es el primer ratón transgénico descrito que expresa la proteína fluorescente Katushka, resultaba importante valorar si la expresión generalizada de dicha proteína es compatible con todas las etapas del desarrollo del ratón. Para ello se procedió a cruzar ratones del modelo Tg.CAG-LSL-Katushka con animales de la línea Tg.CMV-Cre (Ziyk *et al.*, 1998), en la que el promotor de citomegalovirus (CMV) dirige de forma constitutiva y ubicua la expresión de Cre.

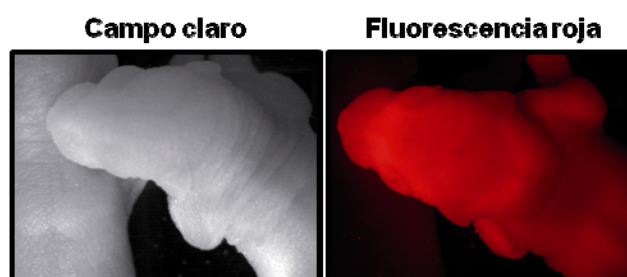
Una vez establecidos los cruces se genotipó la descendencia y se analizó mediante *Southern Blot* de ADN de biopsias de cola el nivel de recombinación inducido en ratones dobles transgénicos (Figura 64). Como puede apreciarse, la expresión constitutiva de Cre induce una recombinación total del alelo



**Figura 64. Análisis por Southern Blot de la eficiencia de recombinación tras cruce con un modelo inductor de recombinación ubicua.** A. Representación esquemática del alelo trazador de la actividad de Cre antes y después del evento de recombinación. Se indican los sitios de restricción para *EcoRI* (E) y *SacI* (S). La sonda genómica utilizada (rectángulo negro), que reconoce el cDNA de Katushka, y el tamaño de los fragmentos esperados en cada análisis. B. Análisis de la eficiencia de recombinación por Southern Blot de ADN genómico de biopsias de cola; las bandas de 2.2 y 0.8 Kb corresponden al transgén trazador antes y después del evento de recombinación, respectivamente.

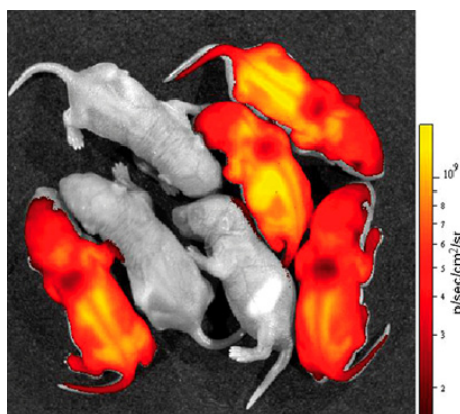
trazador en el tejido analizado, mientras que en ausencia de Cre se conserva intacta la estructura original del transgén. Al mismo tiempo se analizó la emisión de fluorescencia en crías dobles transgénicas mediante observación directa en un estereoscopio de fluorescencia. La expresión de Katushka es claramente detectable en la piel de crías dobles transgénicas mediante adquisición de fluorescencia roja, al tiempo que las crías que no expresan Cre son visibles únicamente en la imagen de campo claro (Figura 65). Estos resultados ponen de manifiesto que *in vivo* el sistema conserva su dependencia y sensibilidad por la actividad de Cre y que el promotor híbrido CAG es capaz de dirigir la expresión generalizada de Katushka sin la aparición de fenotipos deletéreos.

Dado que la expresión de Cre en el modelo Tg.CMV-Cre está presente desde los primeros eventos de la fecundación, cabe esperar que los ratones dobles transgénicos posean versiones recombinadas del alelo trazador también en su línea germinal, con lo que parte de su descendencia expresaría Katushka de forma constitutiva. Para confirmar dicho extremo y evaluar la fertilidad de los ratones dobles transgénicos, éstos animales se cruzaron con otros de genotipo silvestre y se evaluó si la aparición de crías con expresión constitutiva de Katushka seguía las proporciones dictadas por la herencia mendeliana. Tras el análisis de 10 camadas y 70 crías se determinó que el 47.1% hereda una versión escindida y funcional del alelo trazador original. En la figura 66 se muestra una camada representativa analizada en un sistema de imagen óptica *in vivo* no invasiva (IVIS Spectrum, Xenogen).



**Figura 65. Emisión de Katushka tras cruce con un modelo inductor de recombinación ubicua.** En la imagen de campo claro se observa una cría negativa para Tg.CMV-Cre debajo de una cría doble transgénica (Tg.CAG-LSL-Katushka;Tg.CMV-Cre), que es la única visible en el canal de fluorescencia.

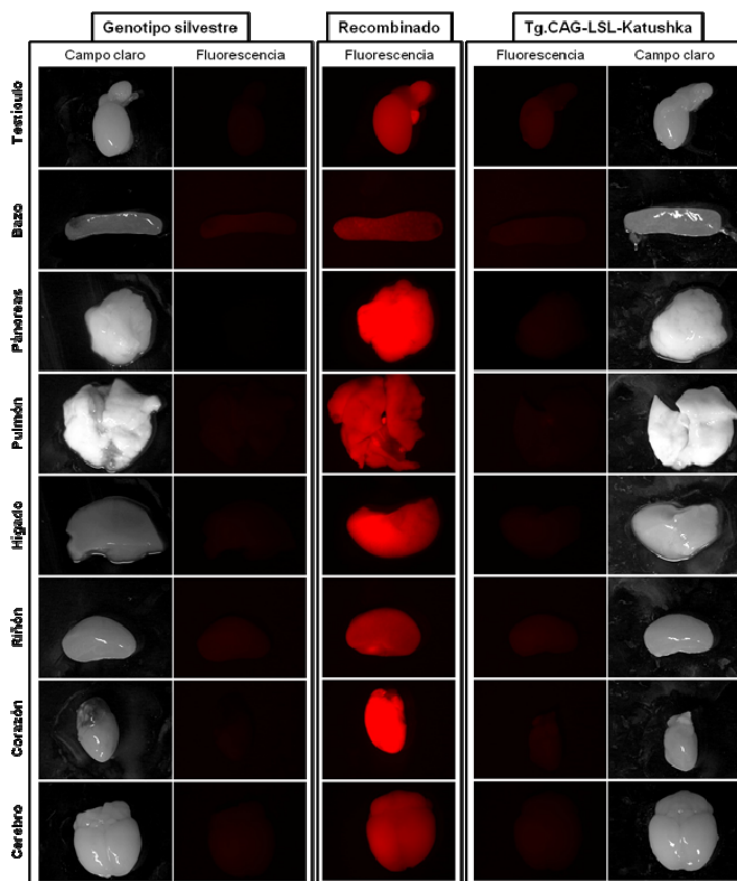




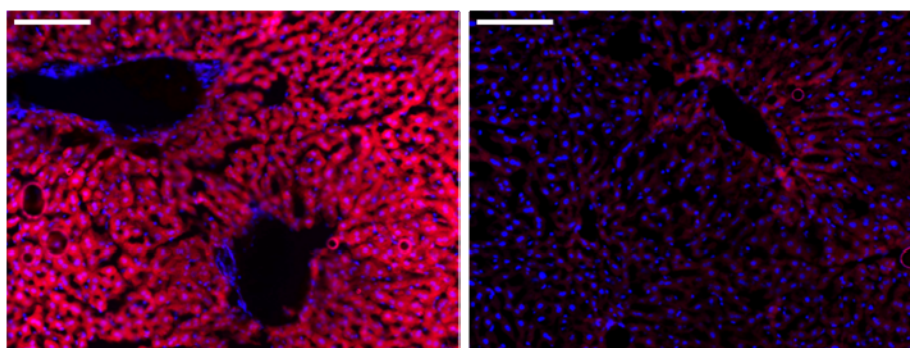
**Figura 66 Emisión de Katushka en crías que heredan una versión recombinada del alelo trazador Tg.CAG-LSL-Katushka.** Imagen de fluorescencia adquirida en un IVIS Spectrum. Camada obtenida tras cruce de un ratón con escisión en la línea germinal con un animal de genotipo silvestre. Las crías fluorescentes heredan el alelo recombinado.

Adicionalmente se evaluó la emisión de fluorescencia roja en los órganos principales de ratones que heredan una versión recombinada del alelo trazador, en comparación con

ratones de genotipo silvestre y aquellos que portan el alelo trazador Tg.CAG-LSL-Katushka sin recombinar. Al respecto, todos los órganos analizados expresan niveles claramente detectables de Katushka, mientras que la fluorescencia emitida por ratones portadores del alelo trazador sin recombinar es indistinguible de aquella procedente de órganos de ratones de genotipo silvestre (Figura 67). Por otra parte, cabe destacar que la señal de Katushka se conserva adecuadamente en criosecciones de órganos fijados con paraformaldehído (PFA) lo cual permite la detección de la fluorescencia en preparaciones histológicas (Figura 68).



**Figura 67. Emisión de Katushka en órganos de animales adultos que heredan una versión recombinada del alelo trazador Tg.CAG-LSL-Katushka.** Comparación con animales de genotipo silvestre y animales portadores del alelo trazador intacto.



**Figura 68. Emisión de Katushka tras fijación con paraformaldehído al 4%.** Imágenes de fluorescencia nativa en criosecciones de hígado de un ratón que hereda el alelo trazador recombinado (izquierda) y uno portador del alelo sin recombinar (derecha). Las barras de escala equivalen a 100  $\mu$ m.

Estos resultados demuestran fehacientemente que la expresión constitutiva y ubicua de Katushka no induce ninguna afectación evidente de las principales funciones vitales en el organismo del ratón y que éstos animales son perfectamente viables, fértiles y capaces de transmitir la mutación a su descendencia.

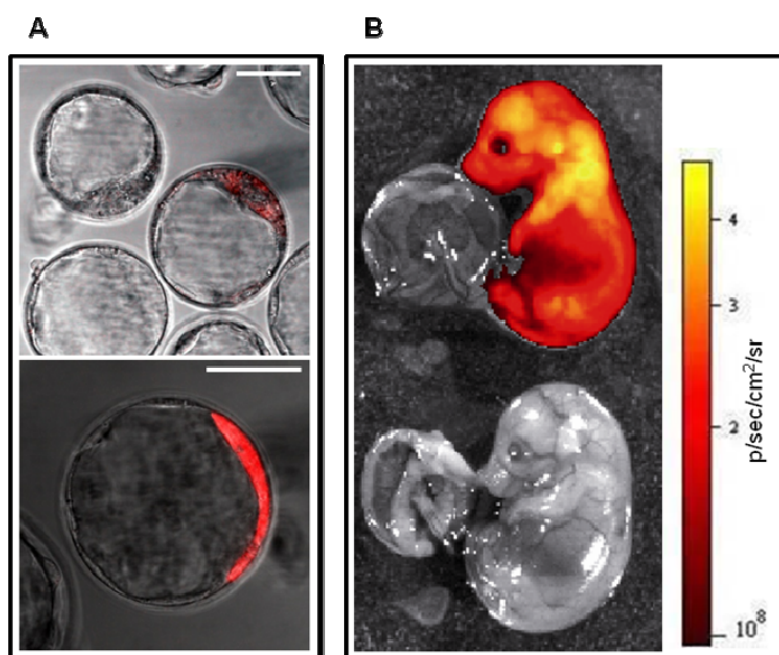
## 5.2 Cruce con modelos inductores de recombinación tejido-específica

El siguiente paso en la caracterización del modelo Tg.CAG-LSL-Katushka consistió en confirmar la potencialidad de dicho sistema para reportar eventos de recombinación mediados por Cre en linajes tisulares específicos. Para ello se establecieron cruces con líneas transgénicas que expresan Cre exclusivamente en determinados linajes celulares durante el desarrollo embrionario o durante el desarrollo postnatal.

### 5.2.1 Cruce con la línea transgénica Tg.Sox2-Cre

Los ratones de la línea Tg.Sox2-Cre expresan la recombinasa Cre bajo la regulación de secuencias promotoras y potenciadoras del gen Sox2 (Hayashi *et al.*, 2002). Dicho gen, y en consecuencia la recombinasa Cre, se expresa de forma específica durante el desarrollo embrionario en las células de la masa celular interna (ICM, *Inner Cell Mass*) que dan origen al epiblasto o ectodermo embrionario, del cual se generan todos los tipos celulares del embrión (Avilion *et al.*, 2003). Así pues, con el objetivo de determinar si con la línea trazadora Tg.CAG-LSL-Katushka es posible detectar eventos de recombinación tejido-específicos durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, se cruzaron machos de la línea Tg.Sox2-Cre con hembras de dicho modelo y se extrajeron embriones a día E3.5 de desarrollo embrionario.

Los resultados obtenidos (Figura 69) reflejan claramente que la línea transgénica Tg.Sox2-Cre induce recombinación tejido-



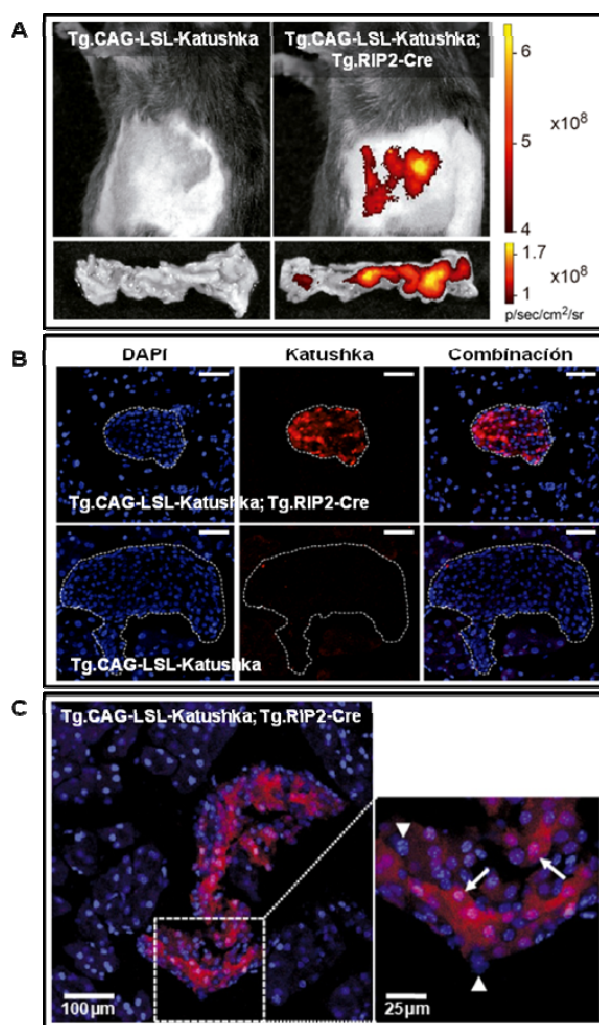
**Figura 69. Expresión de Katushka específicamente en el epiblasto de embriones. A.** Imagen conjunta de campo claro y fluorescencia en una sección confocal de blastocistos a E3.5 (imagen superior) y E4.5 (imagen inferior). Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m. La emisión de Katushka se restringe a la ICM de blastocistos doble transgénicos. **B.** Emisión de fluorescencia (IVIS Spectrum) en embriones a E15.5. La emisión de Katushka se restringe al cuerpo del embrión doble transgénico (superior); debajo se muestra un control negativo

específica en la ICM del blastocisto y que el modelo Tg.CAG-LSL-Katushka permite la detección de dichos eventos de recombinación mediante la adquisición de la señal fluorescente emitida por Katushka. La expresión de Katushka en embriones dobles transgénicos a E3.5-E4.5 se restringe exclusivamente a la ICM y es fácilmente detectable en un polo del blastocisto en desarrollo (Figura 69 A). Adicionalmente, se permitió que algunas gestaciones progresaran hasta E15.5 y se analizó la expresión de Katushka en embriones de dicha edad gestacional. En este caso la emisión de fluorescencia se limita a los tejidos embrionarios (procedentes de la ICM), mientras que los tejidos extraembrionarios (procedentes, al menos en parte, del trofotodermo) son negativos para Katushka (Figura 69 B).

### 5.2.2 Cruce con la línea transgénica Tg.RIP-Cre

Los ratones de la línea Tg.RIP-Cre (Gannon *et al.*, 2000) expresan la recombinasa Cre bajo un fragmento del promotor 2 del gen de la insulina de la rata (RIP2, *Rat Insulin Promoter 2*), que confiere especificidad por las células  $\beta$  de los islotes del páncreas principalmente. Si bien la identidad de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos se especifica desde etapas tempranas del desarrollo embrionario (Jorgensen *et al.*, 2007), no es sino hasta la edad adulta del animal cuando éstas estructuras alcanzan su máximo desarrollo. Así pues, este modelo ofrece la posibilidad de evaluar si la línea trazadora Tg.CAG-LSL-Katushka permite la detección de eventos de recombinación mediados por Cre en poblaciones celulares específicas en un ratón adulto.

Una vez establecidos los cruces e identificados los ratones portadores de las dos construcciones transgénicas se procedió a analizar la emisión de fluorescencia en animales de 12 semanas utilizando un sistema de imagen óptica *in vivo* no invasiva (IVIS Spectrum). Como puede observarse (Figura 70), la señal de Katushka es claramente detectable mediante esta técnica en ratones dobles transgénicos. La especificidad pancreática de la señal detectada se confirmó mediante análisis *ex vivo* del páncreas de dichos ratones, en comparación con el mismo órgano de ratones portadores del alelo Tg.CAG-LSL-Katushka no recombinado.



**Figura 70. Emisión de Katushka en las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos.** A. Monitorización de recombinación mediante técnicas de imagen no invasivas (IVIS Spectrum). La emisión de fluorescencia únicamente es detectable en el ratón doble transgénico. En el panel inferior se muestran los páncreas de cada animal tras la disección. B. Emisión de fluorescencia (imagen confocal) en criosecciones de los páncreas. Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m. C. Imagen confocal de islotes pancreáticos de ratones dobles transgénicos. Se señala la presencia de células positivas (flechas) o negativas (cabezas de flecha) para Katushka.

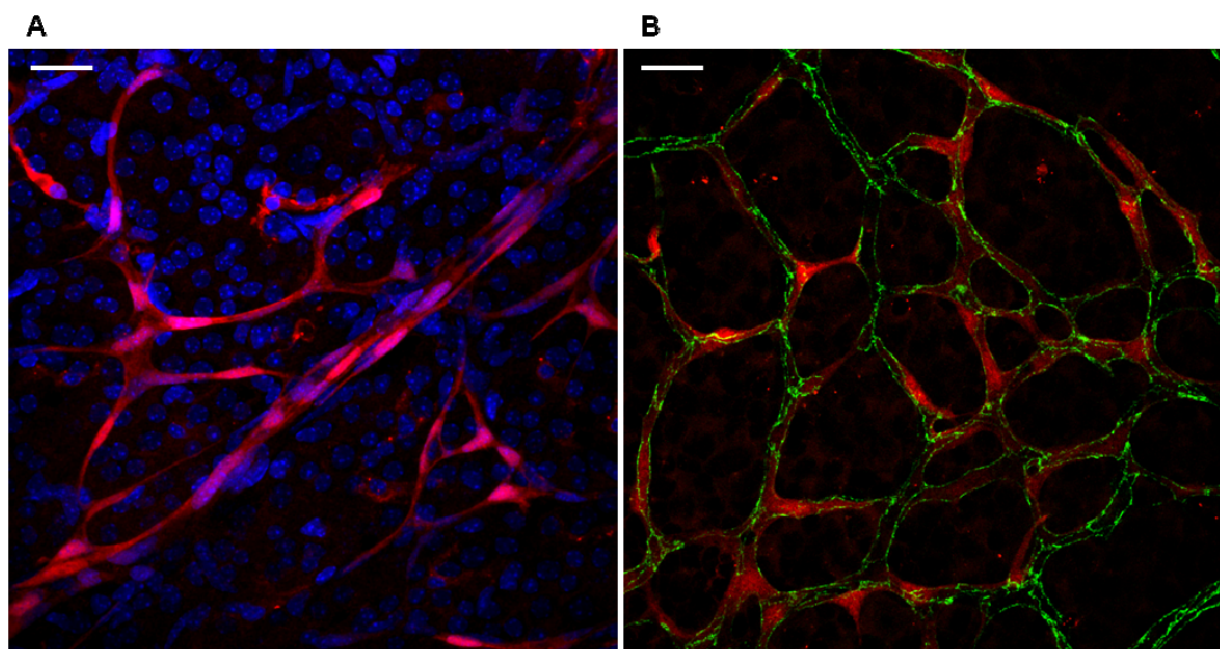


Adicionalmente, mediante análisis por microscopía confocal de crio secciones del páncreas se estableció que la señal fluorescente proviene exclusivamente de algunas células de los islotes de Langerhans. Así pues, el modelo trazador generado permite detectar *in vivo*, mediante técnicas de imagen óptica no invasivas, la ocurrencia de eventos de recombinación dirigidos por Cre incluso en poblaciones celulares restringidas localizadas en un órgano interno. Este resultado pone de manifiesto la potencialidad y versatilidad de la línea trazadora Tg.CAG-LSL-Katushka, al tiempo que confirma su especificidad y estricto control espacial.

### 5.2.3 Cruce con el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup>: Aplicación al estudio de los vasos sanguíneos

El modelo Tg.CAG-LSL-Katushka puede ser utilizado para la visualización y el análisis de los vasos sanguíneos en combinación con modelos que expresen la recombinasa Cre en dichas estructuras vasculares. Así pues, el establecimiento de una línea portadora del alelo *knockin Tie2*<sup>CreERT2</sup> y del alelo transgénico Tg.CAG-LSL-KFP ha permitido, previa inducción mediante tratamiento con tamoxifeno, la visualización de los vasos sanguíneos en virtud de su expresión de fluorescencia roja.

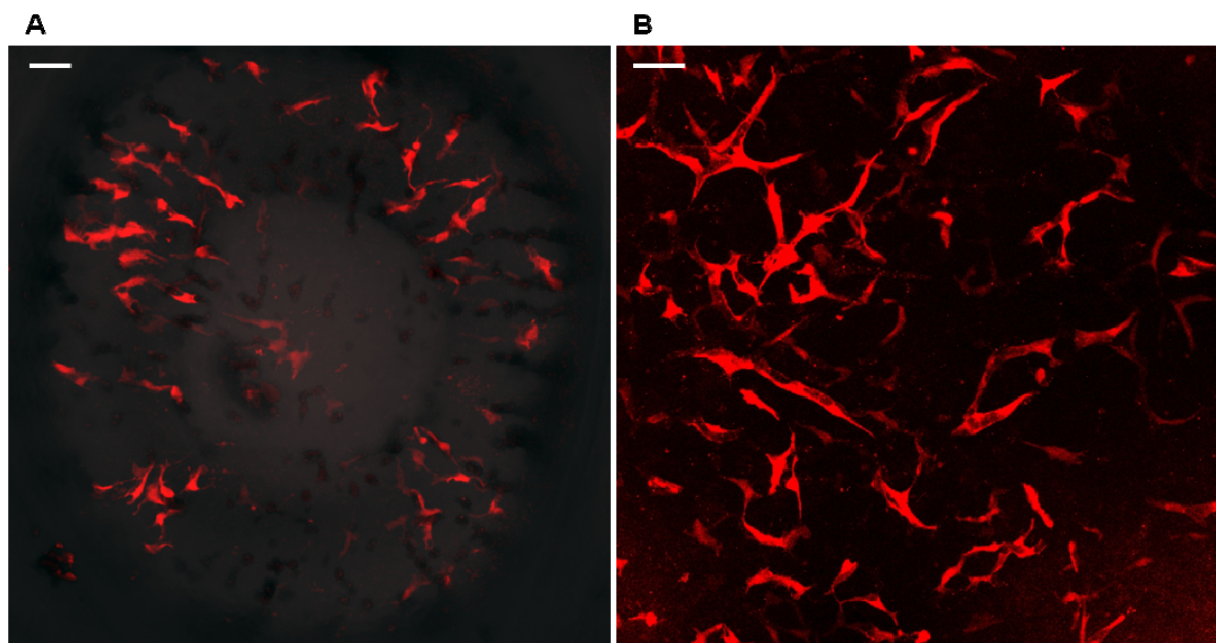
La primera plataforma de análisis utilizada para la caracterización de este modelo fue la vasculatura en desarrollo de la retina del ratón neonato. Así pues, se indujo recombinación mediante inyección intragástrica de tamoxifeno (50 µg) durante tres días consecutivos (P1 a P3) y se analizó la vasculatura de la retina a P8. Tras la inducción de recombinación con dicho protocolo, es posible obtener imágenes detalladas de la red vascular de la retina mediante detección de la fluorescencia nativa de Katushka por microscopía confocal (Figura 71).



**Figura 71. Expresión de Katushka en el endotelio vascular de la retina de ratones portadores de los alelos *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y Tg.CAG-LSL-Katushka, inducidos con 50 µg de tamoxifeno de P1 a P3. A. Imagen confocal (proyección máxima) de fluorescencia nativa de Katushka (rojo) en retina a P8; los núcleos se tiñen DAPI (azul). B. Imagen confocal (proyección máxima) de fluorescencia nativa de Katushka (rojo) e inmunofluorescencia con anticuerpo para CD31 (verde) en retina a P8. Las barras de escala equivalen a 25 µm.**

Con el objetivo de confirmar fehacientemente la naturaleza endotelial de las células positivas para Katushka, se analizó el patrón de expresión de dicho trazador en comparación con la señal obtenida tras inmunofluorescencia para el marcador endotelial CD31 (Figura 71 B). Al respecto, la gran mayoría de las células que expresan Katushka poseen a su vez antígenos reconocidos por el anticuerpo anti-CD31. La co-localización de ambos marcadores no es total dado que la expresión de Katushka se circunscribe al citoplasma celular, mientras que CD31 es una molécula de la membrana celular con especial relevancia en las uniones intercelulares (Albelda *et al.*, 1991).

La utilidad del modelo Tg.CAG-LSL-Katushka para la visualización de vasos sanguíneos cuyas células endoteliales han sufrido eventos de recombinación Cre-dependientes se ha puesto de manifiesto también durante el desarrollo embrionario. Así pues, la inducción de recombinación tras la administración de 5 mg de tamoxifeno por vía IP a hembras gestantes (E10.5), permite la visualización de redes vasculares sanguíneas mediante adquisición de señal fluorescente en embriones a E12.5 (Figura 72).

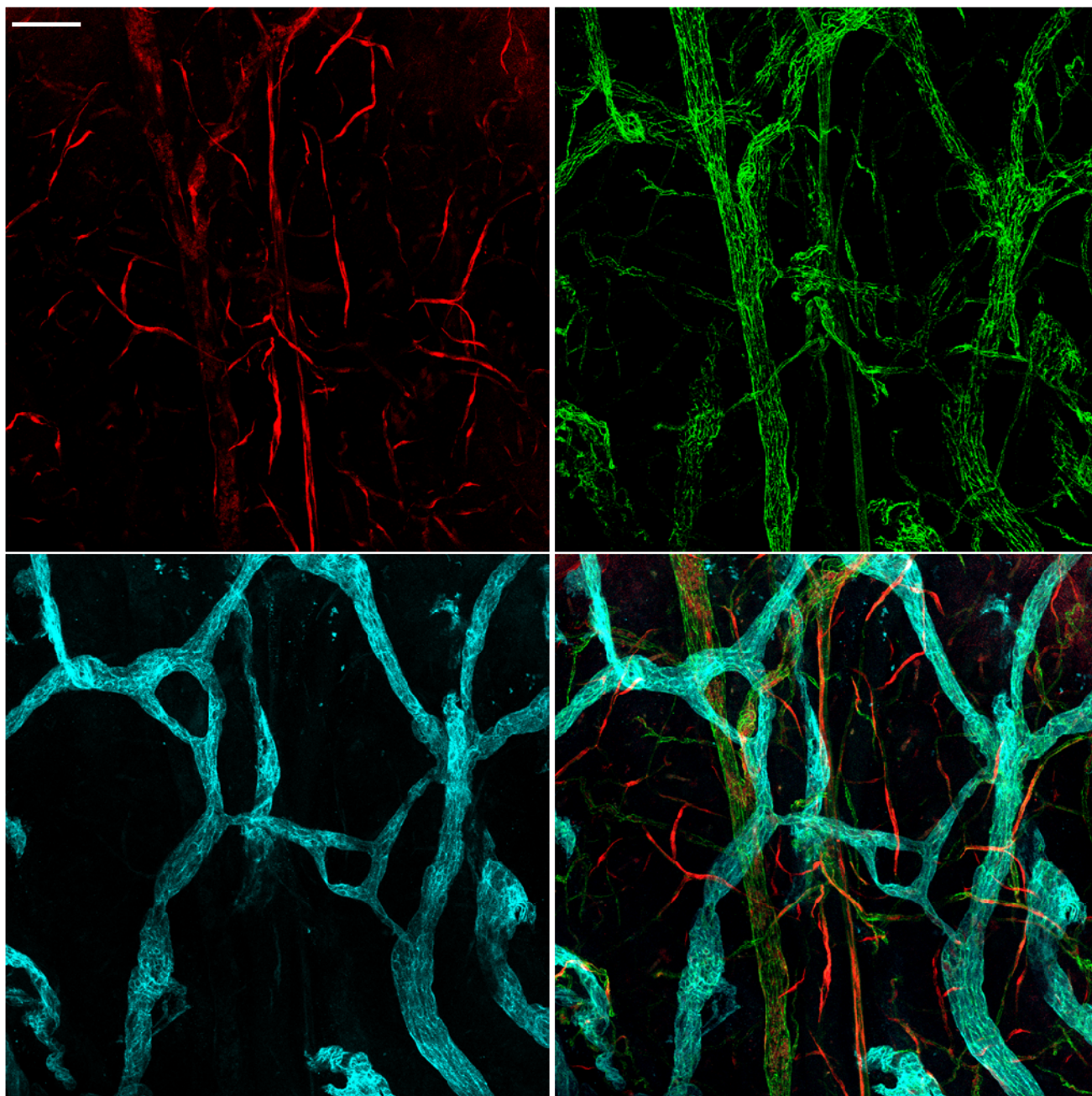


**Figura 72. Expresión de Katushka en el endotelio vascular de embriones portadores de los alelos *Tie2<sup>CreERT2</sup>* y Tg.CAG-LSL-Katushka, inducidos con 5 mg de tamoxifeno a E10.5. A. Imagen confocal (proyección máxima) de fluorescencia nativa de Katushka (rojo) en la región ocular de un embrión a E12.5. B. Imagen confocal (proyección máxima) de fluorescencia nativa de Katushka (rojo) en la región cefálica anterior de un embrión a E12.5. Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m.**

Adicionalmente, la línea Tg.CAG-LSL-Katushka ha sido de utilidad para el análisis de la especificidad del patrón de recombinación inducido por el modelo *Tie2<sup>CreERT2</sup>* mediante ensayos de co-localización de marcadores de la vasculatura sanguínea y linfática. Así pues, por inmunofluorescencia en preparación completa se analizó la expresión de los marcadores endoteliales CD31 y VEGFR3, en conjunto con la señal nativa de Katushka, en la piel de la oreja (ver apartado 5.2.5 de Materiales y Métodos). El marcador CD31 posee carácter pan-endotelial, aunque se expresa con mayor intensidad en los vasos sanguíneos; por su parte, el receptor VEGFR3 es uno de los marcadores de endotelio linfático mejor caracterizados (Kaipainen *et al.*, 1995; Sleeman *et al.*, 2001), de forma tal que, en conjunto, ambos marcadores permiten discriminar adecuadamente los vasos sanguíneos de los linfáticos. Bajo dicha



premisa se analizó la piel del pabellón auricular de ratones de tres semanas de edad en los que la recombinación se indujo mediante inyección intragástrica de tamoxifeno (50 µg) durante tres días consecutivos (P1 a P3). Los resultados obtenidos (Figura 73) permiten concluir que la recombinación inducida por *Tie2*<sup>CreERT2</sup> se limita al endotelio vascular sanguíneo con especial predilección por los capilares y vasos de pequeño calibre al tiempo que la expresión de Katushka no es detectable en el endotelio vascular linfático. Estos resultados están en concordancia con el análisis de especificidad realizado mediante inmunohistoquímica para marcadores endoteliales en secciones consecutivas de diversos órganos (ver apartado 2.2.5 de Resultados).



**Figura 73. Análisis de la especificidad de la recombinación inducida por el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> en el endotelio vascular sanguíneo . Imagen confocal (proyección máxima) de fluorescencia nativa de Katushka (rojo) e inmunofluorescencia para CD31 (verde) y VEGFR3 (cyan) en la piel de ratones de tres semanas de edad tratados con 50 µg de tamoxifeno de P1 a P3. En la Imagen Inferior derecha se muestra la combinación de los tres canales. La barra de escala equivale a 100 µm.**



### **5.3 Generación de un modelo con expresión ubicua y constitutiva de Katushka (Tg.CAG-Katushka)**

Mediante recombinación del alelo trazador Tg.CAG-LSL-Katushka en la línea germinal es posible obtener una línea transgénica con expresión ubicua de Katushka. Una vez escindida la secuencia de parada de transcripción en las células gametogénicas, la progenie de estos ratones heredará una versión recombinada (Tg.CAG-Katushka) del alelo trazador original y por tanto expresarán Katushka bajo el control del promotor híbrido CAG de carácter ubicuo. La identificación de los ratones que heredan una versión escindida del alelo trazador puede realizarse mediante genotipado por PCR o bien por observación directa de la epifluorescencia en la piel de ratones jóvenes, en virtud de la expresión generalizada de Katushka.

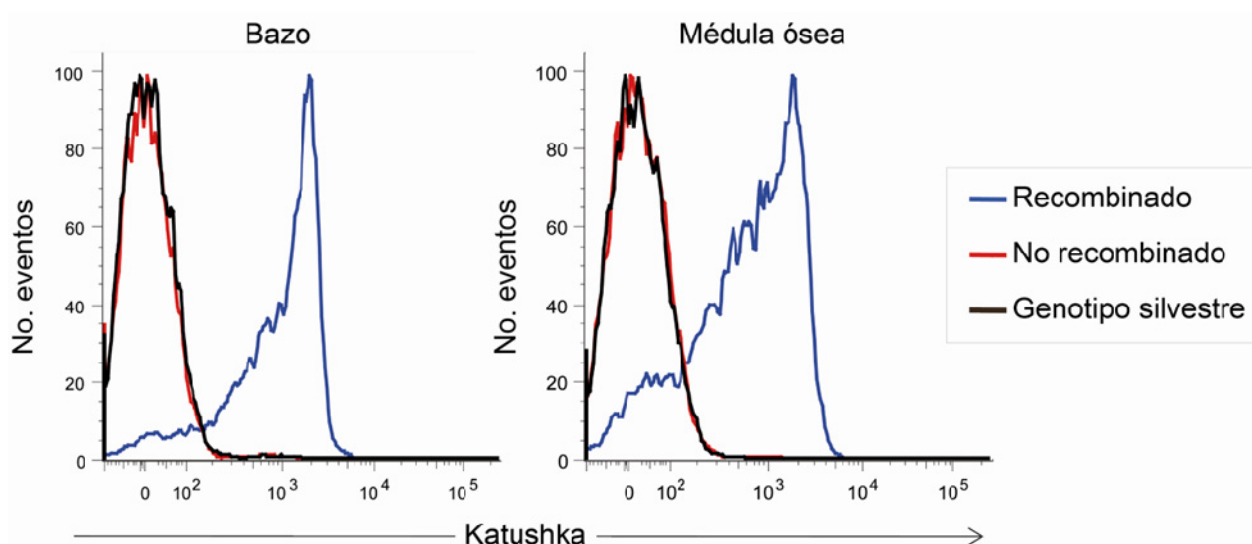
Esta línea tiene dos aplicaciones fundamentales. Por una parte, garantizar la disponibilidad de un modelo animal que sirva como fuente de células poseedoras de una característica genética diferencial (la expresión de Katushka) que facilita considerablemente su detección. Dicho modelo constituye una herramienta valiosa para experimentos de destino celular o "*homing*" después de transplante de poblaciones celulares específicas, ya que permite identificar fácilmente la contribución de dichas poblaciones a estructuras o eventos asociados a un proceso biológico complejo por ejemplo inflamación, regeneración tisular o crecimiento tumoral. Por otra parte, la expresión constitutiva de Katushka por parte de la mayoría de las células de un ratón permite disponer de un modelo en el que se pueden inocular células tumorales y analizar, en el contexto del desarrollo del tumor, las interacciones entre las células del huésped que conforman el estroma tumoral y las propias células cancerosas.

#### **5.3.1 Expresión de Katushka en células hematopoyéticas de la línea Tg.CAG-Katushka**

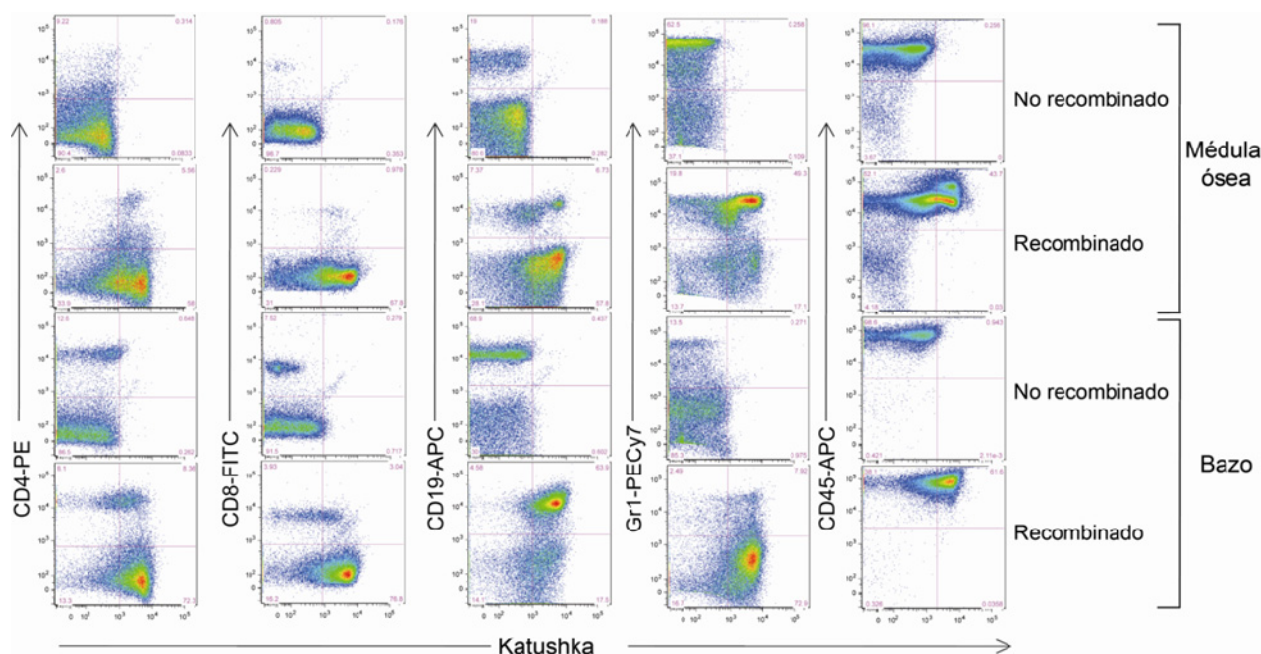
Una vez establecida la línea con expresión constitutiva de Katushka (Tg.CAG-Katushka), se procedió a analizar los niveles de emisión de fluorescencia roja por parte de las poblaciones celulares hematopoyéticas. Para ello se prepararon suspensiones celulares de la médula ósea y el bazo y se analizaron directamente mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos (Figura 74) reflejan que tanto en el bazo como en la médula ósea la mayoría de las células presentes son capaces de expresar Katushka a niveles que las hacen perfectamente diferenciables de poblaciones de genotipo silvestre.

A continuación se procedió a fraccionar la suspensión celular original mediante la inmunodetección de marcadores de superficie específicos para las principales poblaciones hematopoyéticas. Así pues, mediante citometría de flujo se analizó la expresión de Katushka en células hematopoyéticas diferenciadas (CD45-positivas), linfocitos T (CD4- o CD8-positivos), linfocitos B (CD19-positivos) y granulocitos (Gr1-positivos). Como puede observarse (Figura 75), la mayoría de las células de todas estas poblaciones expresan niveles de Katushka que las hacen perfectamente diferenciables de poblaciones de genotipo silvestre o de poblaciones celulares portadoras del alelo Tg.CAG-LSL-Katushka

sin recombinar. Así pues, se demuestra que el modelo con expresión constitutiva de Katushka constituye una fuente valiosa de células hematopoyéticas que, en virtud de su fluorescencia, pueden ser fácilmente seleccionadas y purificadas. Potencialmente dichas células pueden ser inoculadas en un ratón coisogénico o inmunosuprimido y estudiar su contribución en el desarrollo tumoral o en otros procesos biológicos de interés.



**Figura 74. Expresión de Katushka en células no fraccionadas de bazo y médula ósea.** Análisis de la expresión de Katushka por citometría de flujo en suspensiones celulares de animales que heredan una versión recombinada del alelo trazador Tg.CAG-LSL-Katushka respecto a animales de genotipo silvestre o que portan dicho alelo sin recombinar.

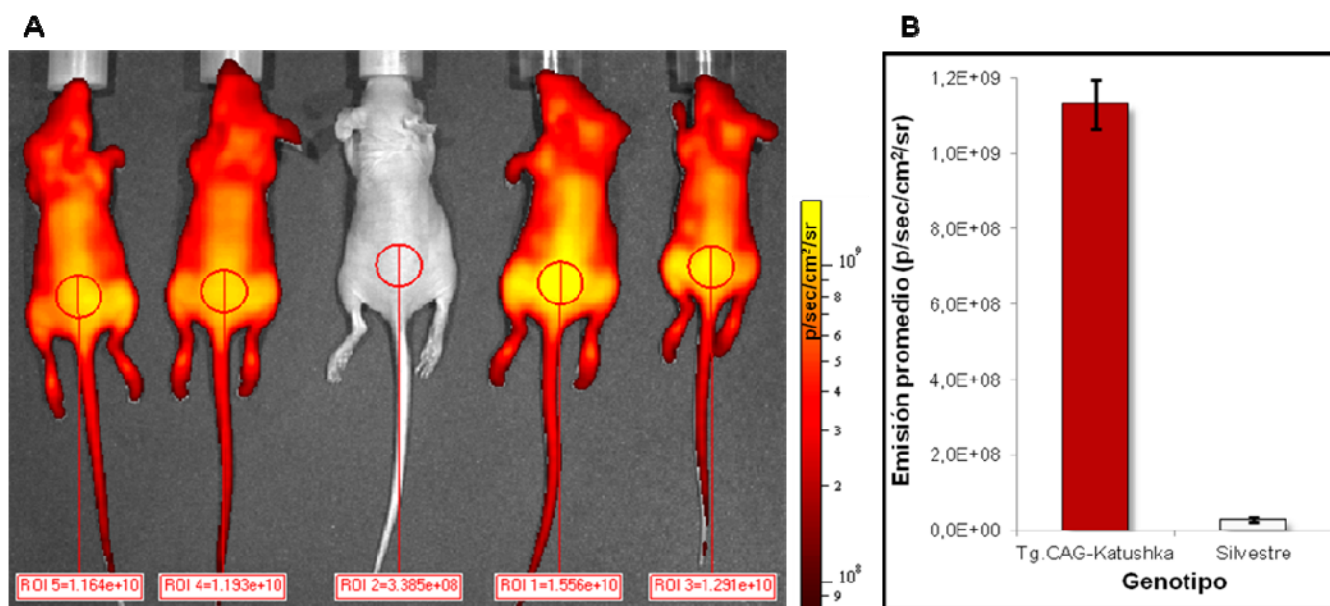


**Figura 75. Expresión de Katushka en distintas poblaciones celulares de bazo y médula ósea.** Análisis de la expresión de Katushka por citometría de flujo en poblaciones celulares fraccionadas de animales que heredan el alelo Tg.CAG-LSL-Katushka recombinado o no recombinado.

### 5.3.2 Generación de la línea Tg.CAG-Katushka;*Foxn1*<sup>nu</sup>

Con el objetivo de poder estudiar las interacciones que tienen lugar en el estroma tumoral entre las células cancerosas y las células provenientes del huésped, se estableció una línea con expresión constitutiva de Katushka en ratones atímicos de fenotipo desnudo (*Foxn1*<sup>nu</sup>). Dichos ratones poseen una mutación espontánea recesiva en el gen *Foxn1* que determina una severa deficiencia en la función de las células T (Nehls *et al.*, 1994). En consecuencia, no poseen células citotóxicas efectoras y no exhiben respuesta inmunológica contra injertos o trasplantes, por lo que han sido ampliamente utilizados en la investigación oncológica como receptores de células tumorales humanas o de otras especies.

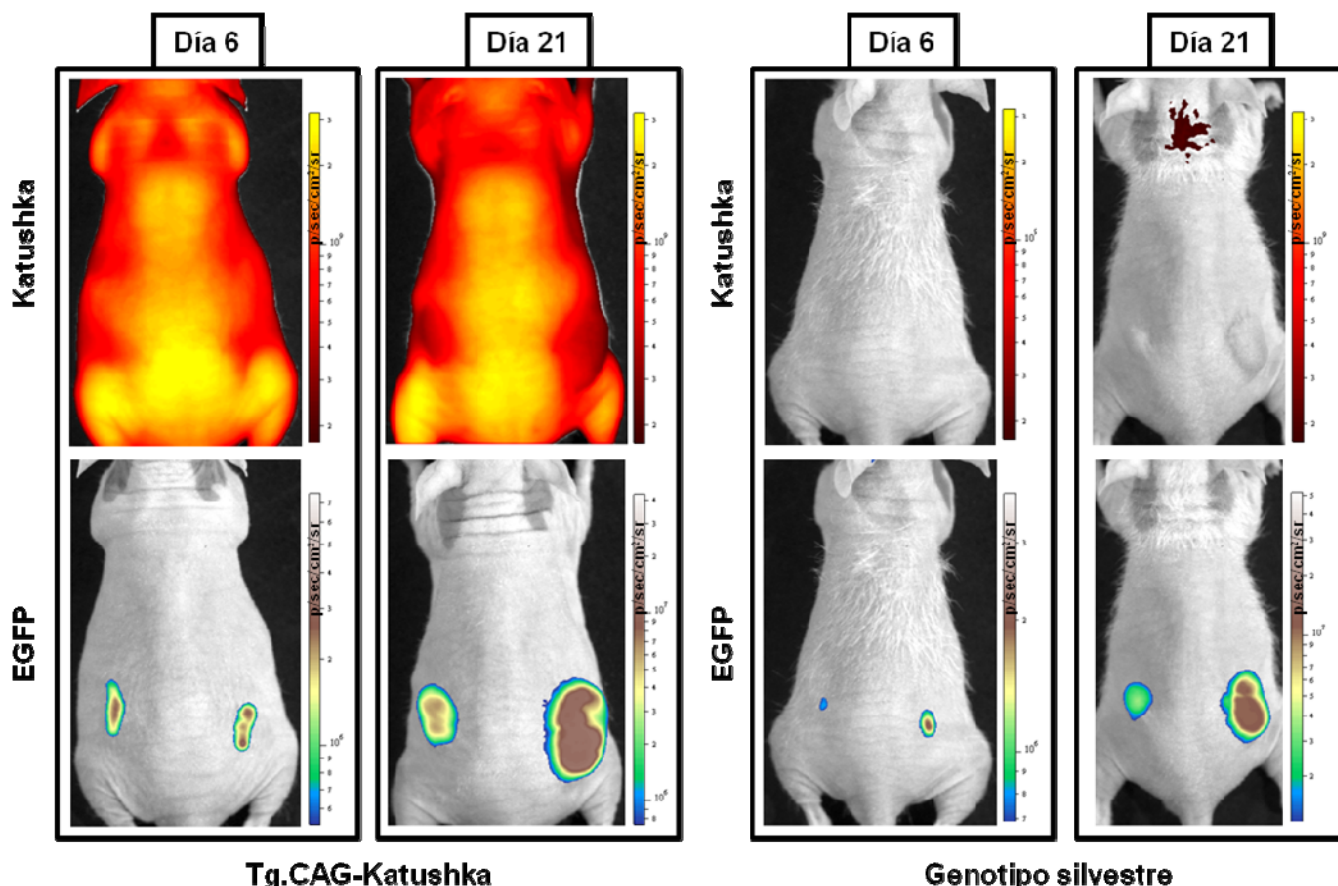
Para el establecimiento de esta línea se llevaron a cabo varias rondas de cruce entre ratones atímicos y aquellos portadores del alelo Tg.CAG-Katushka hasta conseguir ratones homocigotos para la mutación *Foxn1*<sup>nu</sup> y heterocigotos para Katushka. La expresión constitutiva de la proteína fluorescente en ratones atímicos es fácilmente detectable mediante sistemas de imagen *in vivo* y en comparación con ratones de genotipo silvestre la emisión de fluorescencia es unas 40 veces mayor (Figura 76).



**Figura 76. Emisión de fluorescencia en ratones atímicos desnudos (*Foxn1*<sup>nu</sup>) con expresión constitutiva de Katushka. A.** Imagen adquirida en un equipo IVIS Spectrum de ratones *Foxn1*<sup>nu</sup> portadores del alelo Tg.CAG-Katushka (los cuatro con señal fluorescente) o de genotipo silvestre (el único sin señal). Los círculos indican las regiones de interés (ROIs) utilizadas para cuantificar la señal fluorescente. **B.** Cuantificación de la emisión de fluorescencia promedio (±SEM) en los ROIs definidos para ratones *Foxn1*<sup>nu</sup> portadores del alelo Tg.CAG-Katushka (n=8) o de genotipo silvestre (n=5).

Una vez constituida la colonia y con el objetivo de visualizar las interacciones entre el estroma tumoral derivado del hospedero y las células cancerosas, se realizaron ensayos de xenotransplante con líneas de células ES de ratón o de melanoma humano (SK-MEL-146) transfectadas de manera estable con la proteína verde fluorescente EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). De cada uno de estos tipos celulares se inyectaron dos millones de células en los flancos de ratones atímicos con expresión constitutiva de Katushka y se monitorizó el desarrollo tumoral a lo largo del tiempo mediante adquisición *in vivo* de fluorescencia en un equipo IVIS 200 (Xenogen) (Figura 77). Como puede apreciarse, según

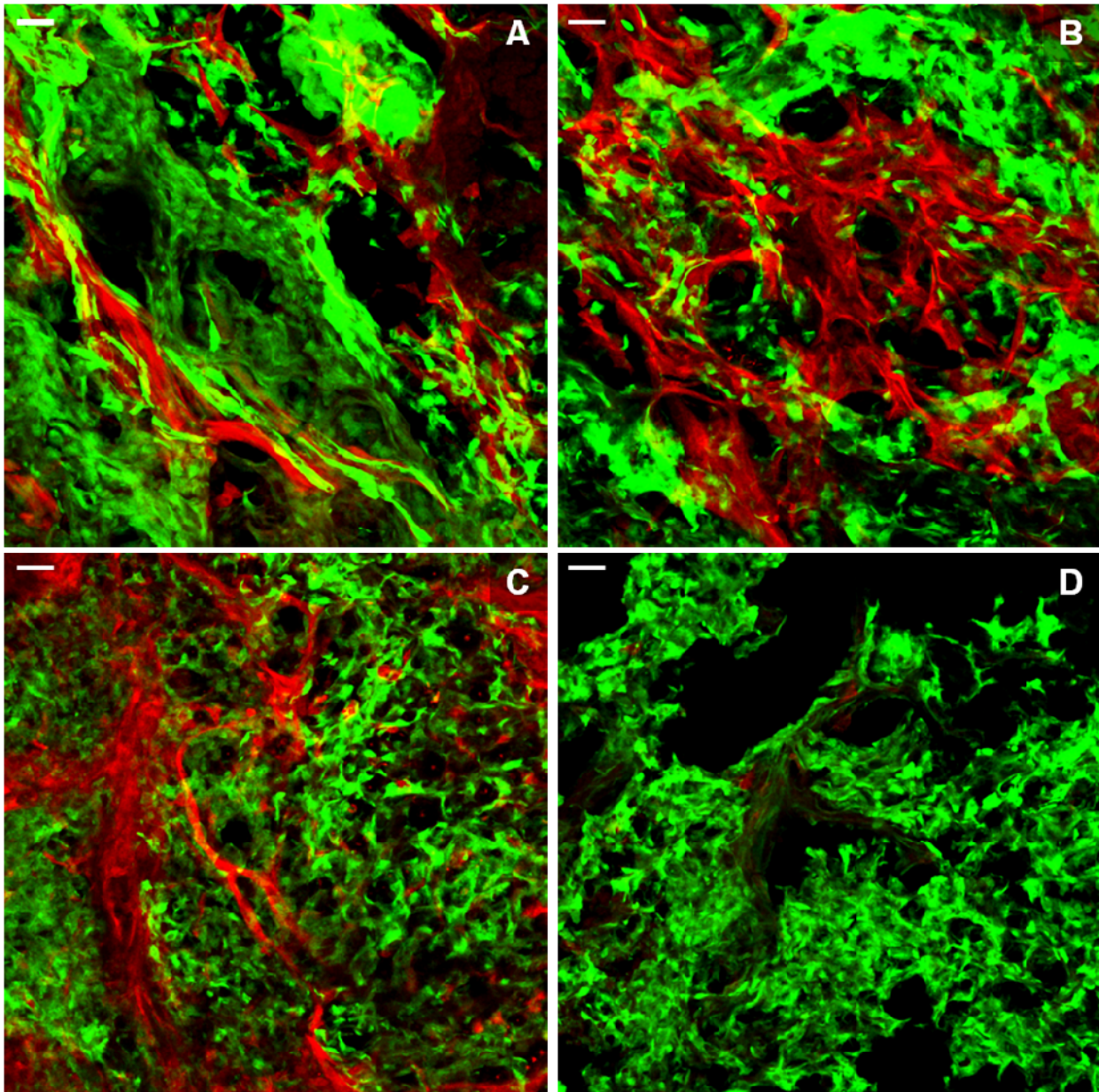
aumenta el tamaño de los tumores se observa un incremento en el área de emisión de fluorescencia verde, sin embargo no se detecta un aumento en la señal de Katushka en el área peri-tumoral o directamente en el tumor. De hecho, en el tumor, la señal de Katushka se atenúa probablemente debido a la interferencia que supone la masa tumoral, intensamente positiva para EGFP.



**Figura 77. Expresión de Katushka en ratones *Foxn1*<sup>tm</sup> y EGFP en tumores originados por xenotransplante de células ES o SK-MEL-147. Imágenes de fluorescencia adquiridas en un equipo IVIS 200 de ratones *Foxn1*<sup>tm</sup> portadores del alelo Tg.CAG-Katushka o de genotipo silvestre inyectados con dos millones de células ES (flanco izquierdo) o SK-MEL-147 (flanco derecho) transfectadas con EGFP.**

Si bien bien hasta ahora no se ha conseguido monitorizar *in vivo* el incremento en la vascularización tumoral mediante detección de Katushka en el animal completo, el análisis histológico de los tumores en un microscopio confocal sí permite identificar claramente las células provenientes del huésped gracias a su emisión de fluorescencia roja (Figura 78). Así pues, en criosecciones fijadas con PFA al 4% es posible diferenciar inequívocamente las células tumorales positivas para EGFP y las células del estroma tumoral, positivas para Katushka, tanto en teratomas como en melanomas. Dadas las altas tasas de vascularización de dichos tumores la mayoría de las células detectadas por su emisión de fluorescencia constituyen parte de capilares y vasos sanguíneos que irrigan el tumor. Mediante reconstrucción tridimensional de los distintos planos focales es posible obtener imágenes que pueden ser visualizadas desde varios ángulos y de esta manera analizar y estudiar las complejas relaciones espaciales que se establecen en el microambiente del tumor



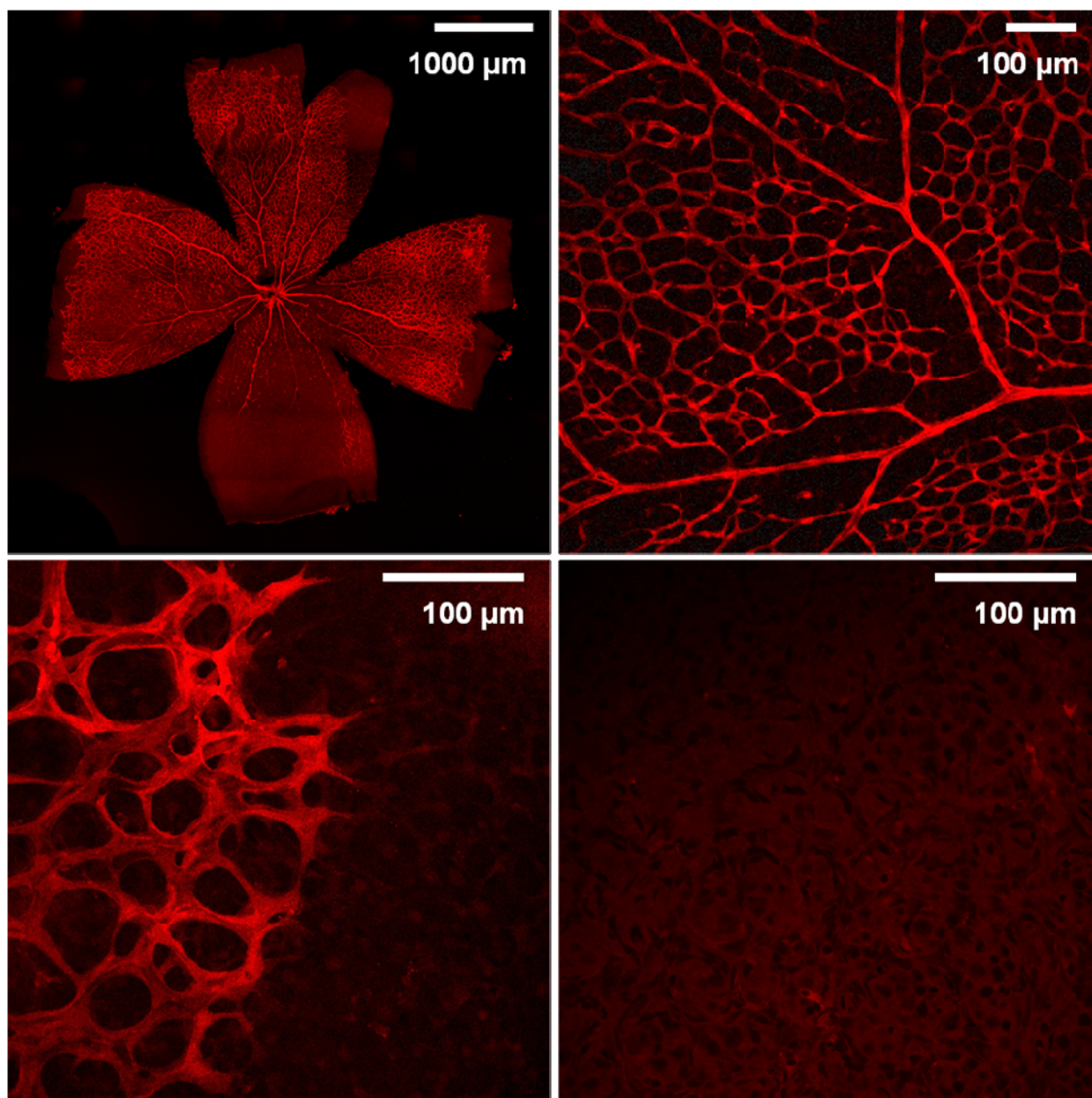


**Figura 78. Expresión de Katushka en el estroma de tumores generados por xenotransplante.** Imagen confocal (proyección máxima) de fluorescencia nativa de Katushka (rojo) y EGFP (verde) en xenotransplantes subcutáneos de células SK-MEL-146 (A y B) o ES (C y D) en tumores desarrollados en ratones *Foxn1<sup>tm</sup>* portadores del alelo Tg.CAG-Katushka (A, B y C) o de genotipo silvestre (D). Las barras de escala equivalen a 25  $\mu$ m.

### 5.3.3 Visualización de la vasculatura sanguínea en órganos específicos

Durante la caracterización de los ratones con expresión constitutiva de Katushka se obtuvo un resultado inesperado que ofrece nuevas e interesantes aplicaciones para este modelo. Si bien, tal como se ha explicado, la expresión de Katushka en esta línea es una propiedad de la práctica totalidad de las células del organismo del ratón, en algunas regiones anatómicas las células que forman los vasos sanguíneos exhiben un nivel de fluorescencia mucho mayor que el resto de las células presentes y permiten ser detectadas de una forma fácil y directa por emisión de fluorescencia de Katushka. Tal es el caso de la retina y la piel del pabellón auricular, dos plataformas de análisis extensivamente utilizadas en el estudio de la biología vascular.

Como puede apreciarse en la figura 79 la vasculatura de la retina de ratones Tg.CAG-Katushka puede ser visualizada en su totalidad mediante adquisición de la señal fluorescente por microscopía confocal, sin que la señal proveniente del resto de las células que conforman la retina dificulte el reconocimiento de los vasos sanguíneos. Así pues, los ratones con expresión constitutiva de Katushka pueden ser una herramienta útil para la visualización en detalle de las estructuras vasculares de la retina sin necesidad de recurrir a procedimientos adicionales de tinción. Si se considera que la retina del ratón es uno de los sistemas experimentales más utilizados para el estudio de los mecanismos de regulación de la neovascularización, resulta evidente que el disponer de una herramienta genética que permite visualizar la totalidad de la vasculatura constituye una ayuda valiosa. Más aún, la señal nativa de Katushka es plenamente detectable incluso después de someter las retinas a los procedimientos

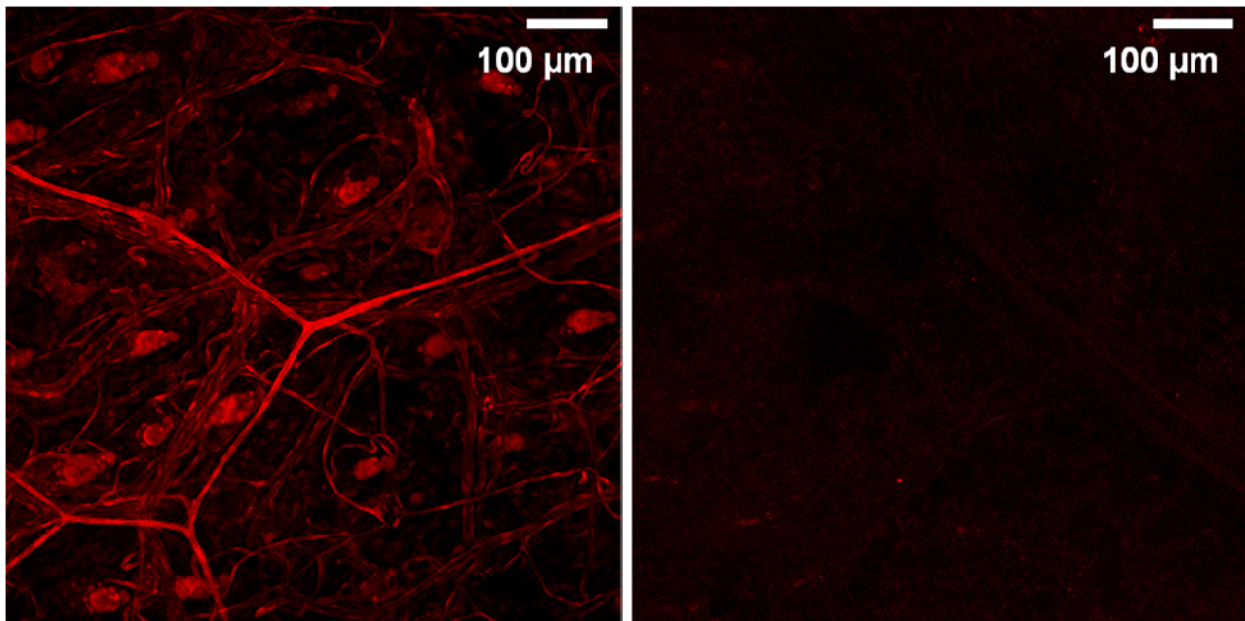


**Figura 79. Emisión de fluorescencia en la vasculatura de la retina de ratones con expresión constitutiva de Katushka. Imagen confocal de fluorescencia nativa de Katushka (rojo) en retinas a P7 de ratones portadores del alelo Tg.CAG-Katushka o de genotipo silvestre (imagen inferior derecha).**



utilizados habitualmente para detección de marcadores por inmunofluorescencia. Así pues, la emisión fluorescente de Katushka puede utilizarse en paralelo a otras tinciones basadas en inmunodetección de antígenos.

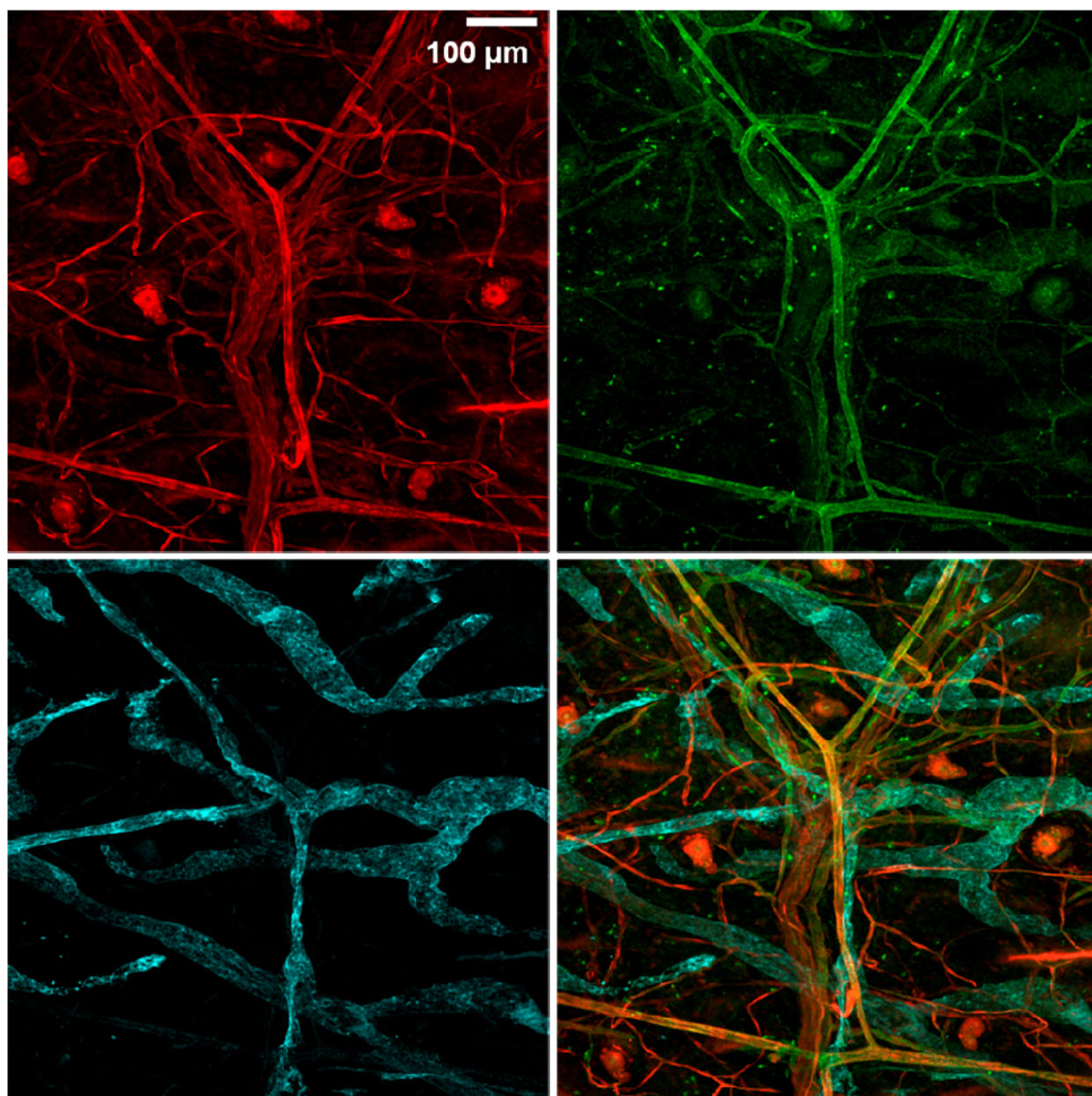
Por su parte, la vasculatura presente en la piel del pabellón auricular también es fácilmente detectada mediante adquisición de señal fluorescente por microscopía confocal. Si bien en la oreja del ratón es más evidente la presencia de otras poblaciones celulares positivas para Katushka, el contraste de la vasculatura respecto al fondo sigue siendo muy alto (Figura 80).



**Figura 81. Emisión de fluorescencia en la piel de ratones con expresión constitutiva de Katushka. Imagen confocal (proyección máxima) de fluorescencia nativa de Katushka en la piel de orejas de ratones portadores del alelo Tg.CAG-Katushka (izquierda) o de genotipo silvestre (derecha).**

Con el objetivo de poder identificar específicamente los vasos sanguíneos y linfáticos, las orejas de ratones con expresión constitutiva de Katushka fueron sometidas a inmunofluorescencia en preparación completa con anticuerpos para Tie2 y VEGFR3 (Figura 81). Los resultados obtenidos indican que la emisión de Katushka es detectada con mayor intensidad en los vasos sanguíneos, mientras que en los linfáticos la señal fluorescente es mucho más débil. Además, la fluorescencia nativa de Katushka permite visualizar algunos capilares que, por su localización profunda en el tejido, no son detectados mediante la inmunofluorescencia.

Si bien no existe aún una explicación definitiva al hecho de que el endotelio vascular sanguíneo sea fácilmente distinguible de las demás células positivas para Katushka, es obvio que esta característica inesperada del modelo Tg.CAG-Katushka puede tener interesantes aplicaciones en el estudio de los vasos sanguíneos, al menos en las plataformas de análisis que constituyen la retina y la piel del pabellón auricular. El estudio de la intensidad de la señal en estructuras vasculares en este modelo ha sido extendido a otros órganos sin que hasta el momento se hayan detectado otros tejidos en los que se visualice con tanta claridad la red de vasos sanguíneos.



**Figura 82.** Expresión de Katushka y análisis de marcadores vasculares en la piel de ratones del modelo **Tg.CAG-Katushka**. Imagen confocal (proyección máxima) de fluorescencia nativa de Katushka (rojo) e inmunofluorescencia para Tie2 (verde) y VEGFR3 (cyan) en la piel de ratones con expresión constitutiva de Katushka. En la imagen inferior derecha se muestra la combinación de los tres canales.



---

# DISCUSIÓN

---



En la presente memoria se describe la generación y caracterización de distintas líneas de ratones modificados genéticamente que, en conjunto, constituyen nuevas herramientas para el estudio del sistema vascular sanguíneo *in vivo*, tanto para la disección genética de los mecanismos moleculares que lo regulan, como para la visualización directa de los procesos celulares asociados a su desarrollo. Así pues, se ha generado: a) un modelo para dirigir la modificación condicional de genes específicamente en el endotelio vascular sanguíneo (*Tie2*<sup>CreERT2</sup>); b) un modelo trazador que permite la identificación de las poblaciones celulares que sufren dicha modificación (Tg.CAG-LSL-Katushka); y c) un modelo atímico desnudo con expresión constitutiva de Katushka para visualizar la neovascularización tumoral y la contribución del hospedero al estroma neoplásico.

Por otra parte, empleando modelos genéticos murinos, entre ellos *Tie2*<sup>CreERT2</sup>, se ha estudiado la función celular autónoma de la actividad tirosina quinasa del receptor c-Met, específicamente en el endotelio vascular sanguíneo, en condiciones fisiológicas y patológicas. Dicho receptor es un reconocido mediador de la actividad angiogénica a través de diversos mecanismos directos e indirectos, sin embargo, la relevancia específica de su función de señalización en las células endoteliales no había sido abordada en modelos genéticos *in vivo*.

## 1. Diseño y caracterización del modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup>

El primer objetivo del presente trabajo consiste en la generación y caracterización de un modelo murino para la inducción condicional de modificaciones genéticas específicamente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos de un organismo vivo complejo. Este tipo de herramienta permite la disección genética de los mecanismos moleculares que regulan las funciones del endotelio a través del estudio de la contribución de un gen en particular en un momento y contexto fisiológico determinado. La relevancia de este tipo de modelos radica en la importancia de la función del endotelio en la patogenia de numerosas enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la inflamación, entre otros desórdenes.

La estrategia diseñada para la generación de esta línea consiste en la modificación dirigida del gen *Tie2* por *gene targeting*, de forma tal que el alelo modificado de lugar a un mensajero bicistrónico que codifica para el receptor Tie2 y para la recombinasa inducible CreERT2. Para ello, la secuencia codificante de la fusión CreERT2 está precedida por un elemento IRES y ambos se introducen entre el codón de terminación (TAG) y la región 3' UTR de *Tie2*. Así pues, a diferencia de las líneas transgénicas habituales, en este modelo la expresión de la recombinasa inducible es regulada por todas las secuencias del locus endógeno y sin la influencia de efectos posicionales. Adicionalmente, la elección del elemento IRES como sistema de expresión permite conservar la integridad funcional del alelo modificado, de tal forma que se evita la posible aparición de fenotipos por haploinsuficiencia en heterocigosis. Finalmente, la inserción de la secuencia IRES-CreERT2 inmediatamente después del codón de terminación de *Tie2* permite conservar la integridad estructural de la región 3' UTR y de cualquier potencial regulador presente en dicha zona, aunque hasta la fecha no se ha identificado ningún elemento regulatorio en dicha región.



La recombinasa inducible CreERT2 surge de la fusión de la recombinasa Cre a un dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos humano con las mutaciones G400V/M543A/L544A. La combinación de las tres mutaciones reduce drásticamente la afinidad por el estradiol e incrementa la especificidad del dominio de unión a ligando por el 4-hidroxitamoxifeno. Así pues, la afinidad de CreERT2 por dicho ligando exógeno es tres a cuatro veces mayor que la de otras recombinasas inducibles como CreERT y la dosis respuesta es diez veces más sensible (Feil *et al.*, 1997). Por ello, CreERT2 es la recombinasa de elección para la generación de mutaciones somáticas, sujetas a control espacial y temporal, en el ratón (Indra *et al.*, 1999).

La caracterización del modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> mediante su cruce con la línea trazadora de la actividad de Cre, *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>, permite concluir que la nueva línea generada dirige eficientemente la recombinación en el endotelio vascular sanguíneo tras la administración de tamoxifeno, tanto durante el desarrollo embrionario como en el crecimiento postnatal y en el animal adulto. Si bien se ha reportado que, bajo ciertas condiciones, CreERT2 sufre un 5% de recombinación basal en ausencia de tamoxifeno (Feil *et al.*, 1997), en nuestro modelo no ha sido posible la detección de células recombinadas en animales no tratados, así pues la dependencia del sistema por el tamoxifeno es total.

La elección de *Tie2* como elemento para dirigir el patrón de expresión de la recombinasa CreERT2 reside no sólo en su alta especificidad como marcador endotelial, sino también en el hecho de que se expresa en la mayoría de los contextos biológicos a los que se enfrentan las células endoteliales, tanto fisiológicos como patológicos. Así pues, garantiza que durante la quiescencia, activación, maduración, remodelación o regresión vascular, exista expresión de la recombinasa y capacidad potencial de modular la expresión génica del locus diana. Previamente se han descrito dos modelos de recombinación inducible basados en la especificidad endotelial de *Tie2*: a) una línea transgénica que utiliza fragmentos del promotor y potenciador del primer intrón de *Tie2* para dirigir la expresión de CreERT2 (Forde *et al.*, 2002); y b) una línea transgénica basada en un BAC que porta el gen *Tie2* murino modificado, de forma tal que su codón de iniciación (ATG) precede la secuencia codificante de la recombinasa CreERT2 (Korhonen *et al.*, 2009). Así pues, la línea *Tie2*<sup>CreERT2</sup> descrita en la presente memoria constituye el primer modelo en el que la expresión de CreERT2 es dirigida por todas las secuencias regulatorias del locus *Tie2* en su contexto genómico original.

La comparación directa de la línea *Tie2*<sup>CreERT2</sup> con los ratones transgénicos desarrollados por Forde *et al.* (2002) refleja que nuestro modelo *knockin* es capaz de inducir recombinación con mayor eficiencia y especificidad por el endotelio vascular sanguíneo. Si bien las secuencias promotoras y potenciadoras de *Tie2* empleadas en la generación de la mayoría de los modelos transgénicos han demostrado su especificidad por el endotelio vascular (Constien *et al.*, 2001; Forde *et al.*, 2002; Kisanuki *et al.*, 2001), algunos autores han reportado expresión ectópica (Theis *et al.*, 2001), posiblemente secundaria a efectos posicionales asociados al sitio de integración del transgén. Adicionalmente, es factible que ciertas secuencias reguladoras endógenas de *Tie2*, no incluidas en los fragmentos

empleados por la mayoría de dichos modelos, sean capaces de conferir un mayor grado de especificidad por el endotelio de los vasos sanguíneos.

Por su parte, el modelo basado en la modificación del gen *Tie2* contenido en un BAC, desarrollado durante la realización de este trabajo, presenta una mayor similitud con el nuestro en cuanto al control de la expresión de CreERT2. Sin embargo, la caracterización detallada de dicha línea no ha sido publicada por lo que es difícil comparar su comportamiento en cuanto a expresión, inducibilidad y eficiencia de la recombinación. Finalmente, los modelos de recombinación inducible en el endotelio vascular basados en secuencias de otros genes como *Cdh5*, *Pdgfb* y el factor de transcripción SCL (Claxton *et al.*, 2008; Gothert *et al.*, 2004; Monvoisin *et al.*, 2006; Sorensen *et al.*, 2009) son difícilmente comparables con el descrito en la presente memoria dadas las diferencias en las estrategias de caracterización utilizadas en cada línea.

## 2. Análisis de la expresión de *Tie2*

Como se indicó anteriormente, la estrategia seguida para la generación del modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> garantiza que la expresión de la recombinasa inducible esté gobernada por todas las secuencias regulatorias endógenas que dirigen la expresión de *Tie2*, así pues el modelo generado constituye una herramienta única y de gran precisión para el análisis del patrón de expresión de dicho receptor y para el análisis, mediante trazamiento de linajes, de la diferenciación ulterior de poblaciones celulares que expresan *Tie2* en algún momento de su desarrollo.

En sentido general, el análisis del patrón de expresión de *Tie2*, a juzgar por la detección de eventos de recombinación mediados por Cre mediante líneas trazadoras, permite concluir que dicho receptor se expresa principalmente en el endotelio vascular sanguíneo durante todas las etapas del desarrollo embrionario y postnatal estudiadas. Nuestros resultados además confirman que la expresión de *Tie2* en el compartimento vascular sanguíneo durante la edad adulta no es simétrica, siendo mayor en el endotelio de las arteriolas respecto a las vénulas, tal como se había reportado previamente (Anghelina *et al.*, 2005; Mecha Disassa *et al.*, 2008), y en vasos de menor calibre respecto a aquellos de diámetro superior.

### 2.1 Especificidad por el endotelio vascular sanguíneo

En general se considera que los receptores Tie1 y Tie2 son expresados por las células endoteliales del sistema vascular sanguíneo y linfático. Así pues, hasta la fecha no se ha descrito que ninguna población de células endoteliales exprese de forma específica uno sólo de estos receptores. Las demostraciones de la expresión de *Tie2* en el endotelio linfático se basan fundamentalmente en la utilización de anticuerpos (Morisada *et al.*, 2005; Tammela *et al.*, 2005) o de técnicas bioquímicas en células en cultivo (Hamaguchi *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2007). Adicionalmente, existen datos que

sugieren una función *in vivo* de las angiopoietinas en el desarrollo y mantenimiento de los vasos linfáticos (Gale *et al.*, 2002; Morisada *et al.*, 2005; Tammela *et al.*, 2005), sin embargo, es posible que las angiopoietinas puedan mediar su función en el endotelio linfático a través de receptores distintos a Tie2. Al respecto, cabe destacar que la Ang2 es capaz de dirigir algunos programas celulares señalizando a través de la integrina  $\alpha_v\beta_1$  (Hu *et al.*, 2006) y que el bloqueo de dicha integrina es capaz de inhibir la linfoangiogénesis en algunos modelos experimentales (Okazaki *et al.*, 2009).

Si bien existen publicaciones que detallan la relevancia de Tie1 en el desarrollo de la vasculatura linfática (D'Amico *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2010), la importancia específica de Tie2 en el endotelio vascular linfático no ha sido demostrada y no existen evidencias que permitan concluir si su expresión en dicho linaje es una característica común a todas las células. Adicionalmente, el análisis detallado de la expresión diferencial de Tie1 y Tie2 es complicado por las limitaciones de las sondas moleculares diseñadas para discriminar ambos receptores (Augustin *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos durante la caracterización del modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> sugieren que la expresión de *Tie2* es fundamentalmente específica del endotelio vascular sanguíneo o bien que sus niveles de expresión en el endotelio linfático son demasiado bajos como para inducir la recombinación de una forma eficiente. Ésta última parece la explicación más plausible si se toma en consideración que las únicas evidencias de recombinación en células endoteliales de vasos linfáticos se obtuvieron con protocolos de inducción de larga duración (cinco u ocho semanas de tamoxifeno en la dieta) y en uno de los sistemas de análisis de mayor sensibilidad (tinción X-gal en preparación completa de diafragma y peritoneo). Adicionalmente, los reportes previos basados en la inmunodetección de Tie2 refieren que los niveles de expresión de dicho receptor en el endotelio vascular linfático son menores que los presentes en células endoteliales de vasos sanguíneos (Morisada *et al.*, 2005; Tammela *et al.*, 2005).

La especificidad por el endotelio vascular sanguíneo en el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> es una característica establecida desde el desarrollo embrionario. Así pues, tratamientos con tamoxifeno a E10.5 o E12.5 revelan que la práctica totalidad de las células susceptibles de recombinación forman parte o dan origen al endotelio de los vasos sanguíneos, sin que sea posible detectar su presencia en estructuras vasculares linfáticas en el adulto. Previamente se ha descrito que *Tie2* se expresa en el endotelio vascular linfático al menos desde E11.5 del desarrollo embrionario en el ratón, aunque a niveles significativamente menores que los detectados en células endoteliales de los vasos sanguíneos, (Morisada *et al.*, 2005); dicho resultado sería compatible con la interpretación, antes apuntada, de que la expresión de *Tie2* en el endotelio linfático no es lo suficientemente alta como para dirigir recombinación de manera eficiente en dicho compartimento vascular.

El fenotipo de los ratones *knockout* para Tie2 provoca letalidad embrionaria entre E10.5 y E12.5 asociada fundamentalmente a una marcada reducción en el número de células endoteliales, defectos en el desarrollo cardíaco y presencia de hemorragias (Dumont *et al.*, 1994). Así pues, si bien Tie2 no es imprescindible para la diferenciación de las primeras células endoteliales y la formación del plexo

vascular primitivo, sí es necesario para la extensión y maduración de la red vascular en el embrión en desarrollo. Dichos resultados son plenamente compatibles con el patrón de expresión de *Tie2* identificado con el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> durante el desarrollo embrionario. Así pues, la caracterización de nuestro modelo evidencia que la expresión de *Tie2* es detectable desde E8.5 y que constituye una característica común de la mayoría de las células endoteliales embrionarias (tanto de la microvasculatura como de vasos de mayor calibre), incluyendo el revestimiento endotelial de las cavidades cardíacas, a partir de E10.5.

A lo largo del desarrollo postnatal y en la edad adulta, la expresión de *Tie2* es mayor en los capilares sanguíneos y en vasos de menor calibre, en los que muestra cierta preferencia por el endotelio de las arteriolas en comparación con las vénulas. Además su expresión en el endocardio de animales adultos es un evento limitado a algunas de las células endoteliales que lo conforman. Estos resultados sugieren que el papel de *Tie2* en el mantenimiento de la quiescencia vascular puede presentar particularidades en función del estado fisiológico de la célula endotelial o del tipo de estructura vascular en la que ésta se encuentre. La mayor expresión de *Tie2* en el endotelio de las arteriolas respecto a las vénulas puede deberse al efecto de la tensión de corte (*shear stress*), una entidad mecánica que refleja la tensión tangencial generada por el flujo sanguíneo sobre el endotelio y que es mayor en la porción arterial de la vasculatura. En tal sentido, algunos autores han aportado evidencias que reflejan cómo la tensión de corte es capaz de inducir la expresión y activación de *Tie2* y que éste receptor juega un papel relevante en la respuesta vascular a dicha fuerza mecánica (Lee and Koh, 2003; Yang *et al.*, 2012).

## 2.2 Expresión de *Tie2* en la vasculatura de la retina

El análisis de la expresión de *Tie2* en la vasculatura de la retina durante el desarrollo postnatal reproduce en buena medida el patrón descrito anteriormente en el sentido que se especifica a favor de los capilares y el endotelio de las arteriolas a medida que la red vascular madura y alcanza el estado de quiescencia. La modulación en la expresión de *Tie2* a lo largo del proceso de neovascularización retinal podría ser la base de algún mecanismo de regulación del fenotipo endotelial, especialmente si se considera la sensibilidad de este eje de señalización a los cambios en la abundancia relativa de sus principales efectores (las angiopoietinas y *Tie2*) (Augustin *et al.*, 2009). En tal sentido, las variaciones en la expresión de *Tie2* en función de los procesos endoteliales predominantes en cada momento de la neovascularización retinal sugieren una posible función para este receptor en el control molecular de dicho proceso. En sentido general, la máxima expresión de *Tie2* se da durante la fase de mayor crecimiento y proliferación endotelial, moderándose a medida que la red vascular primaria se establece y limitándose a escasas estructuras vasculares (fundamentalmente capilares) en la vasculatura quiescente.

Varios autores han propuesto que el plexo vascular primario de la retina se forma por vasculogénesis (Chan-Ling *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2000), es decir la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de precursores endoteliales que coalescen formando cordones en los que luego se

estructura el lumen. Por otra parte, se ha demostrado que ciertos progenitores endoteliales presentes en la médula ósea son capaces de modular la actividad pro-angiogénica de los astrocitos en la retina y prevenir la degeneración vascular de la retina en modelos experimentales (Friedlander *et al.*, 2007). Sin embargo, la carencia de marcadores fenotípicos definitivos ha limitado la identificación inequívoca de la contribución de los progenitores endoteliales al desarrollo de la vasculatura de la retina (Fruttiger, 2007).

El ensayo de trazamiento de linajes realizado mediante inducción de recombinación durante el desarrollo embrionario (a E10.5) y el análisis de la vasculatura retinal en el animal adulto, demuestra que las células endoteliales que conforman la vasculatura de la retina proceden de células que expresan *Tie2* desde la embriogénesis. Este resultado sugiere que la vasculatura de la retina deriva ya sea de células que, al menos en parte, poseen un fenotipo endotelial diferenciado o de poblaciones progenitoras con expresión de dicho receptor. Si bien no existe consenso respecto a la firma molecular de los progenitores endoteliales circulantes (Deb and Patterson, 2010), los marcadores de superficie más utilizados para su identificación son CD133, CD34 y VEGFR2 (Modarai *et al.*, 2005; Peichev *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2005). Algunas referencias documentan la expresión de *Tie2* por parte de progenitores endoteliales cultivados *in vitro* (Hill *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2010), sin que se establezca con claridad si dicha característica es un efecto secundario a cierto grado de diferenciación o realmente representa una singularidad de los progenitores endoteliales *bona fide*. En cualquier caso, nuestros resultados permiten concluir que la vasculatura de la retina está mayoritariamente formada por células endoteliales procedentes de linajes que expresan niveles detectables de *Tie2* desde, al menos, el día E10.5 del desarrollo embrionario por lo que presumiblemente en su origen poseen un fenotipo endotelial diferenciado.

La identificación de otros marcadores fenotípicos expresados por la población de células *Tie2*<sup>+</sup> que da origen a la vasculatura de la retina en el período postnatal, sería necesaria para confirmar si dicho linaje forma parte de vasos sanguíneos ya establecidos desde el desarrollo embrionario o bien si constituye una población progenitora.

## 2.3 Expresión de *Tie2* en células de linaje hematopoyético

El análisis de la recombinación inducida en poblaciones hematopoyéticas se realizó mediante citometría de flujo en animales homocigotos para el alelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> y hemicigotos para el alelo trazador Tg.CAG-LSL-Katushka. Dicho alelo trazador permite la identificación de eventos de recombinación mediados por Cre a través de la adquisición de fluorescencia roja nativa, procedimiento que es técnicamente más sencillo y versátil que la detección de otras moléculas trazadoras como  $\beta$ -galactosidasa. En todos los casos se analizó la presencia de células Katushka<sup>+</sup> en suspensiones celulares de médula ósea y sangre periférica de animales adultos tratados con tamoxifeno durante distintos momentos del desarrollo embrionario (E12.5) o postnatal (neonatos y animales adultos).



En sentido general, el análisis de la expresión de *Tie2* en células de linaje hematopoyético mediante la caracterización del patrón de recombinación inducido, refleja que la expresión de dicho receptor se limita a una pequeña proporción de células presentes durante el desarrollo embrionario o en etapas tempranas del desarrollo postnatal. Así pues, únicamente la administración de tamoxifeno durante el desarrollo embrionario (5 mg a E12.5) o el desarrollo postnatal temprano (50 µg de P1 a P3) es capaz de inducir niveles de recombinación detectables en células de linaje hematopoyético. Por su parte, la inducción en animales adultos (tamoxifeno en la dieta durante ocho semanas) no permite la detección de células hematopoyéticas recombinadas en sangre periférica o médula ósea.

La expresión de *Tie2* en poblaciones hematopoyéticas ha sido documentada desde las primeras referencias a dicho receptor. Así pues, uno de los primeros reportes de la existencia de los receptores Tie se consiguió mediante el clonaje de ADNc a partir de ARNm de células madre hematopoyéticas de médula ósea de animales adultos (Iwama *et al.*, 1993). Por su parte, la expresión de *Tie2* en células madre hematopoyéticas del feto ha sido puesta en evidencia mediante modelos murinos transgénicos con expresión constitutiva de Cre bajo el control de secuencias del promotor de *Tie2*. Dicho modelo es capaz de inducir recombinación en un 85% de las células hematopoyéticas adultas de diversos linajes (Tang *et al.*, 2010), lo cual evidencia que durante el desarrollo fetal, una importante proporción de las células responsables de la hematopoyesis son capaces de expresar *Tie2*. En tal sentido, se ha demostrado que *Tie2* se expresa, a E10.5 del desarrollo embrionario, en células de la región aorta-gónada-mesonefros que constituyen progenitores comunes de las células madre hematopoyéticas y las células endoteliales (Hamaguchi *et al.*, 1999). Incluso se ha establecido una firma molecular (c-Kit<sup>+</sup>; Sca-1<sup>+</sup>; Lin<sup>-</sup>) para una sub-población de células Tie2<sup>+</sup> con capacidad reconstituyente a largo plazo y capaces de diferenciarse a células de linaje linfóide y mieloide (Yano *et al.*, 1997).

Desde el punto de vista funcional, la expresión de *Tie2* en células madre hematopoyéticas de la médula ósea es necesaria para la hematopoyesis postnatal *in vivo* (Puri and Bernstein, 2003). Al respecto, se ha propuesto que *Tie2* es responsable de mediar en la interacción entre las células madre hematopoyéticas y los osteoblastos de la médula ósea; dicha interacción es fundamental para la supervivencia y el mantenimiento de la quiescencia de las células madre y por tanto para su capacidad hematopoyética en el adulto (Arai *et al.*, 2004).

Más recientemente se ha demostrado la existencia de una sub-población de monocitos que expresan *Tie2* y que constituyen un linaje específico de células hematopoyéticas con propiedades pro-angiogénicas de gran relevancia para la neovascularización tumoral (De Palma *et al.*, 2007; De Palma *et al.*, 2005). La identificación de dicha sub-población se realizó en ratones transgénicos que expresan GFP bajo el control de secuencias promotoras y potenciadoras de *Tie2*, en combinación con el análisis de marcadores moleculares de superficie propios de células diferenciadas de linaje mieloide (CD45 y CD11b, entre otros) (De Palma *et al.*, 2005).

La relevancia funcional de la expresión de *Tie2* en dicha población de monocitos ha sido puesta en evidencia gracias a la demostración de la capacidad de Ang2 de promover la migración de estos monocitos mediante mecanismos que dependen, al menos en parte, de la activación de Tie2; al mismo tiempo, Ang2 puede estar asociada a la transmisión de señales secundarias a la hipoxia, uno de los principales promotores angiogénicos (Coffelt *et al.*, 2010; Murdoch *et al.*, 2007). Por su parte, la demostración de la existencia de estos monocitos con expresión de *Tie2* en sangre periférica humana (Venneri *et al.*, 2007) ha estimulado su potencial utilización como posibles dianas terapéuticas, especialmente para el tratamiento de la angiogénesis tumoral (De Palma and Naldini, 2009).

Los resultados obtenidos durante la caracterización de la línea *Tie2*<sup>CreERT2</sup>; Tg.CAG-LSL-Katushka, reflejan que la inducción de recombinación en células hematopoyéticas únicamente es posible tras administración de tamoxifeno durante el desarrollo embrionario (E12.5) o los primeros días de desarrollo postnatal (P1- P3), pero no tras tratamiento de animales adultos con tamoxifeno en la dieta. Estos resultados sugieren que la expresión de *Tie2* en las células hematopoyéticas disminuye a lo largo del desarrollo o en algún momento puntual del mismo, a diferencia de lo que ocurre en la mayor parte de las células del endotelio vascular, que recombinan con una eficiencia incluso mayor cuando la inducción se realiza durante la edad adulta.

Reportes previos (De Palma *et al.*, 2005) indican que, en el ratón adulto, un 2-5% de las células de la médula ósea, y un 1-2% de las células de sangre periférica expresan niveles detectables de *Tie2* en una línea de ratones transgénicos que expresan GFP bajo el control de secuencias promotoras de *Tie2*. Si bien existen discrepancias en cuanto a la proporción que representan las subpoblaciones de células *Tie2*<sup>+</sup> respecto al total de células hematopoyéticas en los distintos reservorios naturales y en diversos momentos del desarrollo, las evidencias que apuntan a que la expresión de dicho receptor es una característica endógena de ciertas poblaciones de células hematopoyéticas adultas parecen concluyentes. Así pues, la ausencia de células positivas para Katushka tras inducción con tamoxifeno en animales adultos del modelo generado, sugiere que la expresión de *Tie2* en las células hematopoyéticas del ratón adulto es demasiado baja como para dirigir la expresión de CreERT2 al nivel necesario para dirigir la recombinación de manera eficiente.

El análisis de antígenos de superficie para la caracterización de las células hematopoyéticas con expresión de Katushka se ha limitado a algunos marcadores de linaje hematopoyético (CD45) y mieloide (CD11b) característicos de la subpoblación de monocitos con expresión de *Tie2* antes mencionada. Hasta el momento no se ha analizado la expresión de marcadores propios de células madre hematopoyéticas (c-Kit, Sca-1 y Lin), sin embargo dicho análisis constituye uno de los objetivos principales para la continuación de este trabajo.

En sentido general, la proporción de células con expresión de CD45 y/o CD11b en la población Katushka<sup>+</sup> es prácticamente idéntica en animales tratados con tamoxifeno durante la embriogénesis o durante el desarrollo postnatal. Así pues, la única diferencia detectada entre estos animales reside en la

abundancia relativa de las células con expresión de Katushka (0.5-0.8% en animales tratados durante el desarrollo embrionario y 0.25% en animales tratados durante los primeros tres días postparto). Por su parte, si se compara la abundancia relativa de las células Katushka<sup>+</sup>; CD45<sup>+</sup>; CD11b<sup>+</sup> respecto al total de células Katushka<sup>+</sup> en la médula ósea y la sangre periférica, se observa que en el primero de estos reservorios, las células positivas para los tres marcadores, es decir los putativos monocitos pro-angiogénicos (a juzgar por la firma molecular propuesta por De Palma *et al.*, (2005)) representan más de un 85% del total, mientras que en la sangre periférica dicha población corresponde a un 30% del total de células Katushka<sup>+</sup>. Estos resultados sugieren que durante el desarrollo embrionario y las primeras etapas del desarrollo postnatal, las células hematopoyéticas con expresión de *Tie2* en la médula ósea constituyen una subpoblación cuya diferenciación ulterior será principalmente hacia un linaje mieloide pro-angiogénico. La movilización de una fracción limitada de dicha población a la sangre periférica podría explicar la presencia de células positivas para Katushka, CD45 y CD11b en la sangre periférica en una menor proporción.

Por otra parte, los resultados obtenidos indican que en la sangre periférica existe una fracción importante (más de un 60%) de células positivas para Katushka (y por tanto presumiblemente para *Tie2* durante el desarrollo embrionario o primeras etapas del crecimiento postnatal) con una firma molecular distinta, que no se ajusta al perfil descrito para los monocitos con expresión de CD45 y CD11b. La caracterización de dicha subpoblación mediante el análisis de otros marcadores de superficie asociados a capacidad progenitora constituye otro de los objetivos fundamentales para completar la caracterización de la recombinación inducida en células de linaje hematopoyético. Igualmente se contempla la utilización de marcadores para otras células de linaje mieloide en las que se ha demostrado expresión de *Tie2* como es el caso de neutrófilos (Lemieux *et al.*, 2005; Sturn *et al.*, 2005), eosinófilos (Feistritzer *et al.*, 2004) y linfocitos (Nowak *et al.*, 2004), aunque dichas poblaciones también pueden expresar CD11b.

Así pues, en general los resultados obtenidos indican un nivel de recombinación en el linaje hematopoyético menor del esperado en todos los casos. Esta situación puede deberse a que los niveles de expresión de *Tie2* no son lo suficientemente altos como para dirigir recombinación eficientemente en dicha población celular, como se comentó anteriormente. Otra posible explicación podría estar asociada a cierta dificultad en la recombinación del alelo Tg.CAG-LSL-Katushka en poblaciones hematopoyéticas, particularmente cuando es usado como trazador de sistemas de recombinación inducible. En tal sentido, la utilización de otras líneas trazadoras de la actividad de Cre, como *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>, en las que la susceptibilidad a la recombinación es máxima, podría constituir una alternativa válida para descartar dicha posibilidad. En definitiva, más trabajo experimental es necesario para completar la caracterización del patrón de recombinación inducido por el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> en las células hematopoyéticas y comprobar si bajo otras condiciones de análisis sea posible detectar una mayor proporción de células recombinadas. En este sentido, la posibilidad de inducir recombinación específicamente en células hematopoyéticas *Tie2*<sup>+</sup> constituiría una herramienta de gran interés para el estudio de la regulación molecular de los mecanismos que dirigen la contribución de dicha subpoblación a la neovascularización y la hematopoyesis.

## 2.4 Expresión de *Tie2* en otros tipos celulares

Durante el desarrollo embrionario es posible detectar en nuestro modelo eventos de recombinación en células que no forman parte del endotelio vascular. Tal es el caso de algunos nidos eritroides y megacariocitos en el hígado fetal. Previamente se ha documentado, mediante análisis citométrico con anticuerpos monoclonales anti-*Tie2*, la expresión de dicho receptor en una fracción de células madre hematopoyéticas que representan el 0.01-0.02% de las células del hígado fetal a día E14.5 del desarrollo embrionario (Hsu *et al.*, 2000). Así pues, la recombinación detectada en el hígado fetal puede reflejar la expresión de *Tie2* en precursores del linaje hematopoyético.

Por su parte, la identificación de eventos de recombinación en células ajenas al endotelio vascular durante el desarrollo postnatal y la edad adulta se limita a algunos haces musculares, particularmente cuando la inducción se realiza durante los primeros días de desarrollo postnatal. Esto puede deberse a la expresión de *Tie2* en células satélite (Abou-Khalil *et al.*, 2009), que corresponden a las células madre musculares adultas. No existe información respecto a una posible regulación de los niveles de expresión de *Tie2* a lo largo del desarrollo que justifique porqué la recombinación en haces musculares es detectable únicamente cuando la inducción se realiza durante etapas tempranas del desarrollo postnatal. En principio puede ser debido o bien a una mayor expresión de *Tie2* en dichas células satélite durante la etapa postnatal o bien a una mayor susceptibilidad del locus reporter (*Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup>) a la recombinación mediada por Cre en este periodo y en estas células.

## 3. Inactivación de c-Met en el endotelio vascular sanguíneo

El receptor c-Met constituye una diana de gran interés en el desarrollo de terapias para el tratamiento del cáncer debido a la importancia y diversidad de los mecanismos patogénicos en los que participa como mediador de señalización intracelular. En consecuencia, diversos agentes inhibidores de su actividad han sido desarrollados y han demostrado capacidad de bloquear parcialmente la progresión tumoral en ensayos clínicos de fase III. En general, los inhibidores del eje de señalización HGF/c-Met pueden ser agrupados en tres categorías: a) inhibidores de HGF o sus activadores; b) antagonistas de c-Met; y c) inhibidores de la actividad tirosina quinasa de c-Met (Gherardi *et al.*, 2012). Uno de los mecanismos asociados a la capacidad anti-tumoral de los inhibidores de HGF/c-Met radica en su actividad anti-angiogénica (Heideman *et al.*, 2004; Kuba *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2007), capaz de inducir una reducción en la densidad de la microvasculatura tumoral mediante la afectación de la supervivencia y motilidad de las células del endotelio vascular. Por otra parte, el bloqueo conjunto de c-Met y las vías de señalización mediadas por VEGF ha demostrado una mayor capacidad para inhibir el crecimiento de la vasculatura tumoral, al mismo tiempo que reduce la invasividad y capacidad metastásica de las células cancerosas (You *et al.*, 2011)

Numerosas evidencias obtenidas en ensayos *in vitro* e *in vivo* sugieren una función importante para la ruta de señalización mediada por HGF/c-Met en el control de las células endoteliales durante procesos de neovascularización. En tal sentido se ha demostrado que HGF es capaz de estimular la migración celular, proliferación y organización de estructuras tubulares similares a los capilares en ensayos *in vitro* con células endoteliales de diferentes especies (Bussolino *et al.*, 1992; Rosen *et al.*, 1990). Así pues, se ha sugerido que c-Met es sobreexpresado durante la recapitulación *in vitro* de diversas etapas de la angiogénesis y que por tanto la sobreexpresión de c-Met constituye un marcador del fenotipo angiogénico en las células endoteliales (Ding *et al.*, 2003).

Por su parte, diversos ensayos *in vivo* realizados en ratones, fundamentalmente mediante la implantación subcutánea de matrigel suplementado con HGF o mediante la administración de dicho agente en ensayos sobre el estroma avascular de la córnea, han demostrado la capacidad pro-angiogénica de HGF (Grant *et al.*, 1993; Silvagno *et al.*, 1995). De hecho se ha propuesto que HGF es un potente agente angiogénico cuya actividad es mediada fundamentalmente a través de acciones directas sobre las células endoteliales (Rosen and Goldberg, 1995) aunque hasta la fecha no se ha abordado la importancia específica de su receptor en dicha población celular. Así mismo, agentes antagonistas de la ruta de señalización de HGF/c-Met como NK4 han demostrado tener actividad anti-angiogénica en ensayos *in vitro* (Jiang *et al.*, 1999) o *in vivo* (Kuba *et al.*, 2000) aunque no se han aportado evidencias directas que demuestren que dicho efecto se debe a una respuesta celular autónoma del endotelio vascular.

Con el objetivo de estudiar la función celular autónoma de la señalización mediada por c-Met específicamente en el endotelio vascular sanguíneo, en este trabajo se ha generado un modelo murino de inactivación condicional de c-Met en el que, tras la administración de tamoxifeno, las células endoteliales expresan una versión de dicho receptor incapaz de inducir la fosforilación de sus dianas intracelulares. La caracterización fenotípica de este modelo, tanto durante el desarrollo embrionario como en la edad adulta, sugiere que la función específica de la actividad tirosina quinasa de c-Met es prescindible durante la neovascularización fisiológica o patológica, y que su ablación es suplida por mecanismos compensatorios con mínimos efectos sobre la capacidad angiogénica del endotelio naciente.

El modelo *knockout* condicional de c-Met utilizado en este estudio ha sido empleado eficientemente para inactivar la señalización mediada por c-Met en distintos tipos celulares (Coudriet *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2005; Factor *et al.*, 2010; Judson *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011; Mellado-Gil *et al.*, 2010) y desde su caracterización inicial (Huh *et al.*, 2004) se demostró que es capaz de eliminar eficientemente el sitio de unión al ATP del dominio tirosina quinasa de c-Met y, consecuentemente, dirigir una dramática reducción en los niveles de activación del receptor y su señalización intracelular. Por su parte, el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> caracterizado en esta memoria ha demostrado ser capaz de inducir eficientemente la recombinación mediada por Cre específicamente en el endotelio vascular sanguíneo con una eficiencia superior al 98% en animales adultos tras tratamiento con tamoxifeno en la dieta



durante ocho semanas consecutivas, o cercana al 70% en embriones tras inyección intraperitoneal de 5 mg de tamoxifeno en hembras gestantes a E10.5 ó E12.5. Así pues, la administración de tamoxifeno a ratones portadores de ambos alelos en homocigosis debe ser capaz de inducir un alto grado de inactivación de la capacidad de señalización intracelular de c-Met mediada por la fosforilación de sus residuos de tirosina.

A pesar de las sugerentes evidencias que relacionan la vía de señalización de HGF/c-Met con la neovascularización fisiológica y patológica, y la demostrada efectividad del modelo utilizado para dirigir recombinación tejido-específica en el endotelio vascular, en ninguno de los sistemas experimentales analizados pudo detectarse una diferencia estadísticamente significativa en la capacidad angiogénica entre ratones con una versión inactiva de c-Met y aquellos equivalentes al genotipo silvestre. Adicionalmente, en todos los experimentos realizados se ha demostrado que la proporción de células endoteliales recombinadas (a juzgar por su expresión de  $\beta$ -galactosidasa) que forman parte de la vasculatura de nueva formación, es indistinguible entre los genotipos analizados. Dicho resultado, en conjunto con la demostración de que los locus del alelo trazador *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> y del alelo *knockout* condicional *c-Met*<sup>fl</sup> recombinan con una eficiencia muy similar, apunta claramente a que la pérdida de la actividad enzimática de c-Met no supone un impedimento importante para que las células endoteliales contribuyan a la angiogénesis fisiológica o patológica y descarta la posibilidad de que la proliferación selectiva de las células endoteliales que han escapado de la recombinación (y por tanto conservan intacta su capacidad de señalización a través de c-Met) sea suficiente para llevar a cabo el proceso de neovascularización con normalidad en ausencia de aquéllas células que han perdido c-Met.

Así pues, los resultados obtenidos y descritos en la presente memoria demuestran por primera vez, utilizando un abordaje genético *in vivo* claro e inequívoco, que la actividad anti-angiogénica asociada a la inhibición de c-Met no parece estar mediada por efectos celulares autónomos de dicho receptor en el endotelio vascular sanguíneo. Estos resultados apoyan los descritos previamente por algunos autores que previamente habían sugerido que los efectos anti-angiogénicos mediados por antagonistas de c-Met se basan, al menos en parte, en mecanismos independientes de la activación de dicho receptor. En tal sentido, la capacidad anti-angiogénica de NK4, un inhibidor competitivo de c-Met, no se limita a los efectos mediados exclusivamente por c-Met, siendo capaz de antagonizar también la actividad de otros factores pro-angiogénicos como bFGF y VEGF (Kuba *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha propuesto que los efectos anti-angiogénicos de dicho inhibidor pueden deberse a su capacidad para inhibir la deposición de fibronectina extracelular en las células endoteliales a través de un mecanismo independiente de la activación de c-Met y mediado por la interacción entre NK4 y perlecano (Sakai *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que el dominio N-terminal de HGF es capaz de inhibir la angiogénesis mediante su acción sobre glicosaminoglicanos endoteliales como el heparán sulfato (Merkulova-Rainon *et al.*, 2003) lo cual evidencia la capacidad de HGF de mediar respuestas celulares mediante mecanismos independientes a la acción de c-Met.

Por otra parte, existen evidencias que apuntan hacia un efecto indirecto de HGF sobre el endotelio a través de la estimulación de la producción de citoquinas pro-angiogénicas como VEGF en células vasculares de músculo liso (Van Belle *et al.*, 1998), queratinocitos (Wojta *et al.*, 1999) o las propias células tumorales (Zhang *et al.*, 2003). Dichas citoquinas podrían constituir en definitiva los estimuladores directos de las células endoteliales durante el proceso de neovascularización. De la misma manera, se ha demostrado que la administración de anti-inflamatorios no esteroideos es capaz de inhibir el efecto angiogénico de HGF, lo cual sugiere nuevamente un mecanismo de acción indirecto, probablemente basado en la estimulación de otros mediadores pro-angiogénicos (Sengupta *et al.*, 2003b). Al mismo tiempo HGF es capaz de inducir la neovascularización en modelos *in vivo* bajo condiciones en las que los receptores de VEGF se encuentran bloqueados farmacológicamente (Sengupta *et al.*, 2003a), esto sugiere que múltiples vías de señalización pro-angiogénicas, no sólo la de VEGF, pueden estar siendo estimuladas simultáneamente en respuesta a HGF. Entre ellas, nuestros resultados indican que la vía de c-Met no es esencial *per se* para la estimulación de angiogénesis.

La inhibición de la señalización mediada por c-Met en las células endoteliales es capaz de impedir la activación de importantes moléculas mediadoras de angiogénesis como Erk1/2 (Kuba *et al.*, 2000), sin embargo, otras rutas de señalización basadas por ejemplo en bFGF o VEGF, son capaces de inducir la fosforilación de dicha proteína. Igualmente, muchos otros de los mediadores de la señalización intracelular de c-Met, como PI3K, FAK o Pak, son activados en respuesta a estímulos angiogénicos transmitidos por receptores típicamente vasculares como los de VEGF o angiopoietinas; así pues, estas vías de señalización podrían participar en la compensación de la pérdida de la actividad enzimática de c-Met. En este sentido sería interesante caracterizar en nuestro modelo si la fosforilación mediada por alguna de estas vías se encuentra alterada en ausencia de c-Met.

Otro mecanismo potencial de compensación podría estar mediado por la participación de distintos co-receptores que han demostrado su capacidad de interactuar con c-Met. Si bien ninguno de estos co-receptores (detallados en el apartado 4.3 de Introducción) posee actividad tirosina quinasa intrínseca capaz de compensar la pérdida de dicha función en el modelo generado, sí podrían mediar la interacción de la versión inactiva de c-Met con otros receptores enzimáticamente activos, o promover su fosforilación mediante el reclutamiento de otras proteínas. En tal sentido se podría especular, por ejemplo, con una potencial actuación del co-receptor neuropilina-2 que, además de unirse a c-Met, es capaz de unirse a los receptores 2 y 3 de VEGF y promover, a través de la señalización mediada por éstos, la supervivencia y migración de las células endoteliales (Favier *et al.*, 2006).

Centrándonos en la función de c-Met en el proceso de regeneración tisular, cabe destacar que tanto HGF como c-Met son sobreexpresados por varios tipos celulares, incluyendo las células endoteliales, en modelos experimentales de cicatrización de heridas *in vivo* en distintas especies animales (Cowin *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2003). Adicionalmente, varias referencias apuntan a un posible rol de HGF y/o c-Met en la promoción de la cicatrización mediante efectos pro-angiogénicos (Bevan *et al.*, 2004; Ha *et al.*, 2003), entre otros. Al mismo tiempo, experimentos en los que se bloquea la

acción de HGF sobre c-Met sugieren que el retraso inducido en el proceso de cicatrización está asociado a una menor formación de tejido de granulación y a una deficiente vascularización del mismo (Yoshida *et al.*, 2003). Sin embargo, ninguno de estos ensayos aborda específicamente la función de HGF/c-Met en las células endoteliales, por lo que los efectos descritos pueden estar mediados por respuestas de otros tipos celulares. De hecho, la expresión de HGF y c-Met no es exclusiva del endotelio vascular siendo una característica común de los queratinocitos, fibroblastos y células inflamatorias presentes en el tejido de granulación.

Por su parte, análisis más detallados de la función de c-Met mediante estrategias similares a las descritas en la presente memoria demuestran su importancia específica en los queratinocitos (Chmielowiec *et al.*, 2007), en los que la ablación de la actividad tirosina quinasa de c-Met impide su contribución al proceso de re-epitelización. Así pues, los defectos observados en la neovascularización asociada a la cicatrización de heridas en ensayos que involucran una inhibición generalizada de c-Met pueden estar mediados por sus efectos sobre tipos celulares distintos al endotelio vascular. Por otra parte, particularmente en ensayos de cicatrización de heridas se ha sugerido que una de las funciones de HGF sería la promoción de la angiogénesis mediante mecanismos paracrinós que involucran la expresión de VEGF en los queratinocitos (Wojta *et al.*, 1999).

Finalmente, en el contexto de la neovascularización tumoral cabe destacar que HGF no sólo es capaz de inducir la expresión de VEGF sino también de inhibir la expresión de trombospondina 1, un potente agente anti-angiogénico (Zhang *et al.*, 2003), reflejando nuevamente que las acciones del eje HGF/c-Met sobre la vasculatura tumoral pueden estar mediadas por mecanismos que actúan de forma indirecta sobre el endotelio vascular. Los resultados obtenidos mediante el ensayo de carcinogénesis química reflejan que la inactividad de c-Met en el endotelio vascular no afecta las tasas de progresión tumoral ni la vascularización de las lesiones neoplásicas.

Un objetivo adicional residía en el análisis de la capacidad metastática de las lesiones generadas. Sin embargo, el ensayo de carcinogénesis química tuvo que ser suspendido antes de que las lesiones neoplásicas progresaran hasta dicho grado de malignidad, dado el tamaño y abundancia de los papilomas cutáneos, incompatibles desde el punto de vista humanitario con el mantenimiento de los animales. Si bien la capacidad metastática se asocia fundamentalmente a características propias de la célula tumoral, un creciente número de publicaciones apunta hacia una función activa de las células endoteliales en la adhesión de las células tumorales al endotelio vascular (St Hill, 2011), un paso imprescindible para su intravasación y diseminación. En tal sentido, la ruta de señalización de HGF/c-Met y algunos de sus co-receptores como CD44 han sido asociados a la adhesión de las células tumorales al endotelio vascular en modelos de cáncer de mama y próstata (Draffin *et al.*, 2004; Mine *et al.*, 2003). Así pues, resultaría interesante analizar si la señalización intracelular mediada por c-Met específicamente en las células endoteliales participa activamente en los mecanismos de captación y adhesión de las células tumorales al endotelio de los vasos sanguíneos o linfáticos.

#### 4. Diseño y caracterización del modelo Tg.CAG-LSL-Katushka

La utilización del sistema Cre/*loxP* como herramienta fundamental de análisis genético *in vivo* en el ratón ha generado la necesidad de desarrollar modelos murinos en los que el nivel de recombinación mediada por Cre pueda ser monitorizado a nivel celular mediante la expresión Cre-dependiente de trazadores moleculares de fácil detección; entre dichos trazadores, las proteínas fluorescentes han adquirido una gran importancia por su versatilidad y eficacia en la visualización y análisis de diversos procesos biológicos. A pesar de ello, la aplicación de las proteínas fluorescentes como trazadores *in vivo* mediante técnicas no invasivas en el animal completo ha sido limitada por la opacidad de los tejidos a la luz de longitud de onda inferior a los 600 nm debido a la absorción por la hemoglobina (Stamatas *et al.*, 2006). Entre 600 nm y 1200 nm, longitud a la cual la luz comienza a ser absorbida por las moléculas de agua, exista una “ventana óptica” en la que los tejidos permiten la transmisión de la luz con mucha mayor facilidad (Tromberg *et al.*, 2000).

La gran mayoría de las proteínas fluorescentes emiten por debajo de los 550 nm aunque recientemente se ha conseguido el desarrollo de nuevas variantes con características espectrales mejoradas. Entre ellas, Katushka, con un máximo de excitación y emisión de 588 y 635 nm, respectivamente, una rápida tasa de maduración a 37°C y un alto coeficiente de extinción molar y rendimiento cuántico, constituye una alternativa con potencial aplicación en la visualización de procesos *in vivo* mediante técnicas no invasivas. En tal sentido, Katushka es una de las proteínas fluorescentes más brillantes con emisión máxima superior a 620 nm y la intensidad de su señal fluorescente más allá de los 650 nm es considerablemente superior a aquella de mCherry, mPlum, mRaspberry o TurboRFP, algunas de las proteínas rojas fluorescentes empleadas con mayor frecuencia (Shcherbo *et al.*, 2007).

En la presente memoria se describe un nuevo modelo murino trazador de la actividad de Cre en el que la expresión de Katushka es inducida mediante recombinación mediada por Cre. En dicha línea, la acción de la recombinasa consiste en la remoción de una señal de parada de transcripción (STOP), flanqueada por sitios *loxP*, que impide la expresión de la proteína roja fluorescente Katushka bajo el control del promotor híbrido CAG. Hasta donde sabemos no existe ningún reporte previo en la literatura que haga referencia a la expresión de la proteína roja fluorescente Katushka en un modelo de ratón transgénico. Así pues, hasta la fecha únicamente se había publicado la expresión temporal de esta proteína fluorescente mediante transferencia eléctrica de ADN en la piel (Gothelf *et al.*, 2010) o el músculo (Hojman *et al.*, 2009) del ratón, en consecuencia, aspectos relacionados con la posible toxicidad causada por la expresión de esta proteína durante el desarrollo embrionario o en la línea germinal estaban por resolver

La utilización del promotor híbrido CAG para dirigir la expresión de Katushka en el modelo trazador de Cre responde a su carácter ubicuo y constitutivo. En comparación con otros promotores constitutivos como el de CMV, CAG es capaz de dirigir la expresión proteica con mayor eficacia y ubicuidad en distintos contextos experimentales analizados (Garg *et al.*, 2004; You *et al.*, 2009). Además, el promotor

CAG es menos susceptible a silenciamiento por metilación que el promotor CMV (Duan *et al.*, 2012). Por otro lado, la eficacia de dicho promotor para dirigir la expresión en células que han adquirido un compromiso endotelial ha sido demostrada previamente (Alexopoulou *et al.*, 2008) lo que posibilita su utilización como trazador de la actividad de Cre en la línea *Tie2*<sup>CreERT2</sup>.

La caracterización del modelo generado demuestra su eficacia y fiabilidad para la monitorización de eventos de recombinación mediados por Cre desde etapas tempranas del desarrollo embrionario y a lo largo del crecimiento postnatal del ratón. Al mismo tiempo, pone de manifiesto la estricta dependencia de la expresión de Katushka respecto a la recombinación mediada por Cre; así pues, a excepción del tejido muscular en animales de la línea fundadora No. 3, no ha sido posible detectar emisión ectópica de fluorescencia en ninguno de los tejidos y órganos analizados. La expresión de Katushka en el tejido muscular de dichos animales puede deberse a efectos posicionales asociados a la integración al azar del transgén dado que no es una característica común a otras líneas fundadoras.

Por otra parte, mediante el cruce de esta línea trazadora con animales de la línea Tg.RIP-Cre que expresan Cre específicamente en las células  $\beta$  del páncreas (Gannon *et al.*, 2000), se ha demostrado su capacidad para identificar eventos de recombinación limitados a poblaciones celulares específicas localizadas en órganos internos mediante técnicas de imagen óptica no invasivas en el animal completo. Este es una característica importante de la línea Tg.CAG-LSL-Katushka ya que no existían reportes previos que evidenciaran dicha potencial aplicación para modelos trazadores basados en la emisión de fluorescencia. Típicamente, trazadores bioluminiscentes, como la luciferasa, sí han sido utilizados exitosamente para la detección *in vivo* de eventos de recombinación internos mediados por Cre en el animal completo (Lyons *et al.*, 2003; Woolfenden *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque la luz emitida por la luciferasa es más de un orden de magnitud más intensa que la fluorescencia y su capacidad de penetración es también mayor (Martinez-Corral *et al.*, 2012), el empleo de proteínas fluorescentes permite adicionalmente el análisis y visualización *ex vivo* de los eventos de recombinación mediante la adquisición de la señal fluorescente nativa a nivel celular, lo que supone una ventaja muy importante sobre la luminiscencia al efecto de monitorizar los eventos de recombinación mediados por la expresión de Cre en un tejido.

## 5. Aplicaciones derivadas de la expresión constitutiva de Katushka

La expresión constitutiva de proteínas fluorescentes en ratones atómicos desnudos ha sido utilizada eficientemente para la visualización y el análisis de las interacciones celulares que tienen lugar en el microambiente tumoral (Suetsugu *et al.*, 2012; Tran Cao *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2004), así como para valorar la eficacia de agentes terapéuticos capaces de inhibir la contribución de las células hospederas (entre ellas el endotelio vascular) al desarrollo del tumor (Ji *et al.*, 2007). Hasta la fecha se han descrito modelos con expresión constitutiva de GFP (Yang *et al.*, 2004), CFP (Tran Cao *et al.*, 2009) y RFP (Yang *et al.*, 2009). Sin embargo, las características espectrales de dichas proteínas limitan sus aplicaciones para la adquisición de imágenes *in vivo* mediante técnicas no invasivas.

En este sentido, el desarrollo de ratones atímicos desnudos Tg.CAG-Katushka puede constituir una contribución relevante para la monitorización de la progresión tumoral en ensayos de xenotransplante, al tiempo que facilita la visualización y el análisis *ex vivo* del estroma tumoral, permitiendo la identificación inequívoca de las células derivadas del hospedero. Adicionalmente, la detección de la fluorescencia nativa de Katushka es compatible con protocolos de fijación tisular habitualmente empleados en la inmunodetección de diversos marcadores y su rango de emisión permite distinguir claramente la señal específica de aquella proveniente de la autofluorescencia endógena. Además, las características espectrales de Katushka permiten su fácil distinción respecto a otras proteínas fluorescentes, ampliando así el rango de marcadores disponibles para el análisis del microambiente tumoral.

Por otra parte, la expresión constitutiva de Katushka en la gran mayoría de las células de los ratones del modelo Tg.CAG-Katushka permite el uso de estos animales como fuente de poblaciones celulares genéticamente marcadas para experimentos de análisis del destino celular. Así pues, tras la selección de una población específica y su transplante a un hospedero sin expresión de Katushka, es posible analizar la contribución de dichas poblaciones a estructuras o eventos asociados a un proceso fisiopatológico complejo. En tal sentido, la demostrada expresión de Katushka en la mayoría de las células de linaje hematopoyético de la médula ósea y sangre periférica de los animales Tg.CAG-Katushka reviste especial relevancia, dada la importante participación de éstas células en distintos mecanismos asociados a la progresión tumoral (Ergun *et al.*, 2008; Huynh *et al.*).

Paradójicamente, la expresión constitutiva de Katushka permite la visualización de las redes vasculares en dos sistemas ampliamente utilizados para el análisis de la biología vascular: la retina y la piel del pabellón auricular. Si bien no existe una explicación definitiva para este hecho, lo más probable es que esté asociado a las características físicas y de organización propias de estas redes vasculares y/o a las propiedades de las células endoteliales que las forman. En tal sentido, el escaso grosor de dichos tejidos así como la abundancia de vasos sanguíneos y su disposición en redes fundamentalmente bidimensionales podría estar favoreciendo su visualización y al mismo tiempo explicaría por qué en otros tejidos analizados no se detectan diferencias en el brillo de la fluorescencia de las células que forman la vasculatura respecto al resto del parénquima tisular, que también expresa Katushka.

Finalmente, cabe destacar que, en paralelo al desarrollo del presente trabajo, nuevas proteínas fluorescentes con máximos de emisión y excitación superiores a 600 nm han sido reportadas (Lin *et al.*, 2009; Shcherbo *et al.*, 2010; Strack *et al.*, 2009). Al mismo tiempo se ha descrito la utilización de una nueva generación de proteínas fluorescentes infrarrojas, que requieren la incorporación de fitocromos como la biliverdina, para la visualización de procesos *in vivo* en el ratón (Filonov *et al.*, 2011; Shu *et al.*, 2009). Si bien estas proteínas poseen características espectrales óptimas con valores de emisión máxima superiores a 700 nm, la dependencia por la biliverdina es un factor a tener en consideración. La biliverdina es un compuesto generado durante el catabolismo del grupo hemo y su presencia es ubicua,



sin embargo, la enzima responsable de su producción (hemo-oxigenasa 1) es inducible por estrés (Ollinger *et al.*, 2007) por lo que la disponibilidad endógena de la biliverdina puede tener importantes variaciones durante el progreso de un proceso patológico. Adicionalmente, la detección de algunas de estas proteínas fluorescentes infrarrojas implica necesariamente la administración exógena de biliverdina (Shu *et al.*, 2009), la cual puede tener diversos efectos anti-inflamatorios (Overhaus *et al.*, 2006) que podrían limitar algunas de sus aplicaciones *in vivo*. En cualquier caso, estos resultados representan nuevas e interesantes alternativas para la visualización *in vivo* de procesos moleculares y reflejan el creciente interés por el desarrollo y aplicación de nuevos trazadores fluorescentes con características espectrales mejoradas.

---

# CONCLUSIONES

---



## 1. Conclusiones relativas al modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup>

- 1.1 Se ha generado una nueva línea de ratones modificados genéticamente que expresa la recombinasa inducible CreERT2 bajo el control transcripcional endógeno del gen *Tie2*. Para ello se ha creado un alelo *knockin* que codifica un mensajero bicistrónico por inserción de un casete IRES-CreERT2 entre el codón de terminación y la región 3'-UTR del gen *Tie2*.
- 1.2 La integración del casete IRES-CreERT2 en el alelo *knockin* no altera los niveles de expresión fisiológicos de *Tie2*, por lo que ratones homocigotos para dicha modificación genética no presentan ningún fenotipo.
- 1.3 El patrón de expresión de CreERT2 recapitula fielmente el del receptor Tie2 durante todos los momentos del desarrollo gestacional y postnatal. Además, la recombinación mediada por Cre ha demostrado una estricta dependencia por la administración exógena de tamoxifeno.
- 1.4 El patrón de recombinación inducido por el modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> está restringido fundamentalmente al endotelio vascular sanguíneo con escasa o nula recombinación en el endotelio de los vasos linfáticos y en células del linaje hematopoyético. En tal sentido, su eficiencia y especificidad por las células endoteliales de los vasos sanguíneos es mucho mayor que la de modelos transgénicos basados en secuencias de *Tie2* generados previamente.
- 1.5 El modelo *Tie2*<sup>CreERT2</sup> constituye una nueva herramienta para la generación de mutantes condicionales específicos del endotelio vascular sanguíneo al tiempo que permite el estudio de la expresión endógena de *Tie2* y el análisis de la contribución de las células que expresan dicho receptor mediante trazado de linajes.

## 2. Conclusiones relativas al estudio de la relevancia de la señalización mediada por el receptor c-Met específicamente en el endotelio vascular sanguíneo

- 2.1 Se ha obtenido un modelo *knockout* condicional del receptor c-Met específicamente en el endotelio vascular sanguíneo (*c-Met*<sup>ΔTie2</sup>) mediante el cruce de la línea *Tie2*<sup>CreERT2</sup> con ratones portadores del alelo *c-Met*<sup>fl</sup>. La presencia adicional del alelo trazador de la actividad de Cre, *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> en esta línea permite identificar inequívocamente las células en las que tiene lugar la recombinación mediada por Cre.
- 2.2 La eficiencia de la recombinación dependiente de tamoxifeno en el alelo trazador *Rosa26*<sup>LSLlacZ</sup> y en el alelo condicional *c-Met*<sup>fl</sup> es prácticamente la misma, por lo es posible asumir que las células que expresan β-galactosidasa carecen de actividad tirosina-quinasa de c-Met.

- 2.3 La ablación de la actividad enzimática de c-Met en las células endoteliales sanguíneas no impide su contribución a la formación de nuevas redes vasculares durante la angiogénesis fisiológica asociada al desarrollo embrionario y a procesos reproductivos en el animal adulto (ovulación, placentación, lactación). Así pues, no se observa ningún fenotipo resultante de la inactivación de c-Met en estos procesos.
- 2.4 La ablación de la actividad de c-Met en las células endoteliales sanguíneas no impide su contribución a la formación de nuevas redes vasculares durante la angiogénesis asociada a procesos fisiopatológicos inducidos experimentalmente como la hipersensibilidad por contacto, cicatrización de heridas y carcinogénesis química. Así pues, no se observa ningún fenotipo resultante de la inactivación de c-Met en estos procesos.
- 2.5 Nuestros resultados indican que la señalización mediada por c-Met en el endotelio no es esencial durante la neovascularización en el ratón. Así pues, la contribución de la ruta HGF/c-Met en el endotelio vascular durante procesos de neovascularización no depende de mecanismos celulares autónomos. Alternativamente, la ausencia de c-Met puede estar compensada por la activación de otras vías de señalización en las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

### 3. Conclusiones relativas al modelo Tg.CAG-LSL-Katushka

- 3.1 Se ha generado una línea de ratones modificados genéticamente que permite la monitorización *in vivo* de la recombinación mediada por Cre, mediante técnicas de imagen no invasivas en el animal completo, a través de la expresión condicional de la proteína fluorescente Katushka, con emisión en el rojo lejano.
- 3.2 Este es el primer ratón transgénico descrito en el que se expresa la proteína fluorescente Katushka. La expresión de dicho trazador molecular en el ratón no tiene ningún efecto tóxico detectable durante el desarrollo embrionario o en el animal adulto.
- 3.3 Mediante recombinación del alelo trazador Tg.CAG-LSL-Katushka en la línea germinal se ha establecido una línea con expresión constitutiva y ubicua de Katushka en todos los órganos analizados incluidas las células hematopoyéticas de la médula ósea y el bazo.
- 3.4 Además, se ha generado una línea de ratones atímicos desnudos (*Foxn1<sup>nu</sup>*) con expresión constitutiva de Katushka que, en ensayos de xenotransplante con líneas celulares cancerosas, permite la identificación y visualización de las células del huésped que participan en el establecimiento de la vasculatura y el estroma tumoral.

---

# BIBLIOGRAFÍA

---





- Abou-Khalil R, Le Grand F, Pallafacchina G, Valable S, Authier FJ, Rudnicki MA, Gherardi RK, Germain S, Chretien F, Sotiropoulos A, Lafuste P, Montarras D, Chazaud B. 2009. Autocrine and paracrine angiopoietin 1/Tie-2 signaling promotes muscle satellite cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 5:298-309.
- Adams DH, Harvath L, Bottaro DP, Interrante R, Catalano G, Tanaka Y, Strain A, Hubscher SG, Shaw S. 1994. Hepatocyte growth factor and macrophage inflammatory protein 1 beta: structurally distinct cytokines that induce rapid cytoskeletal changes and subset-preferential migration in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7144-7148.
- Adams RH, Alitalo K. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:464-478.
- Aftab DT, McDonald DM. 2011. MET and VEGF: synergistic targets in castration-resistant prostate cancer. *Clin Transl Oncol* 13:703-709.
- Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. 1991. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 114:1059-1068.
- Alexopoulou AN, Couchman JR, Whiteford JR. 2008. The CMV early enhancer/chicken beta actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC Cell Biol* 9:2.
- Alva JA, Zovein AC, Monvoisin A, Murphy T, Salazar A, Harvey NL, Carmeliet P, Iruela-Arispe ML. 2006. VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev Dyn* 235:759-767.
- Amoh Y, Yang M, Li L, Reynoso J, Bouvet M, Moossa AR, Katsuoka K, Hoffman RM. 2005. Nestin-linked green fluorescent protein transgenic nude mouse for imaging human tumor angiogenesis. *Cancer Res* 65:5352-5357.
- Anghelina M, Moldovan L, Moldovan NI. 2005. Preferential activity of Tie2 promoter in arteriolar endothelium. *J Cell Mol Med* 9:113-121.
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. 2004. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118:149-161.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967.
- Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. 2009. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:165-177.
- Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. 1994. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 16:901-906.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17:126-140.
- Barinaga M. 1999. New type of blood vessel found in tumors. *Science* 285:1475.
- Bergers G, Benjamin LE. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401-410.
- Bevan D, Gherardi E, Fan TP, Edwards D, Warn R. 2004. Diverse and potent activities of HGF/SF in skin wound repair. *J Pathol* 203:831-838.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:915-925.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376:768-771.
- Boccaccio C, Comoglio PM. 2006. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer* 6:637-645.
- Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffey A, Comoglio PM. 1992. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 119:629-641.
- Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. 2005. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 9:777-794.
- Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395.
- Carmeliet P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9:653-660.
- Carmeliet P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438:932-936.
- Carmeliet P, Collen D. 2000. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J Pathol* 190:387-405.
- Carmeliet P, De Smet F, Loges S, Mazzone M. 2009. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol* 6:315-326.
- Carmeliet P, Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257.
- Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436:193-200.
- Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martinez De La Escalera G. 2009. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 89:1177-1215.

- Claxton S, Kostourou V, Jadeja S, Chambon P, Hodivala-Dilke K, Fruttiger M. 2008. Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium. *Genesis* 46:74-80.
- Coffelt SB, Tal AO, Scholz A, De Palma M, Patel S, Urbich C, Biswas SK, Murdoch C, Plate KH, Reiss Y, Lewis CE. 2010. Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. *Cancer Res* 70:5270-5280.
- Colombo ES, Menicucci G, McGuire PG, Das A. 2007. Hepatocyte growth factor/scatter factor promotes retinal angiogenesis through increased urokinase expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:1793-1800.
- Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. 2008. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov* 7:504-516.
- Comoglio PM, Trusolino L. 2002. Invasive growth: from development to metastasis. *J Clin Invest* 109:857-862.
- Constien R, Forde A, Liliensiek B, Grone HJ, Nawroth P, Hammerling G, Arnold B. 2001. Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *Genesis* 30:36-44.
- Cook-Mills JM, Deem TL. 2005. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol* 77:487-495.
- Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, Vande Woude GF. 1984. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311:29-33.
- Coudriet GM, He J, Trucco M, Mars WM, Piganelli JD. 2010. Hepatocyte growth factor modulates interleukin-6 production in bone marrow derived macrophages: implications for inflammatory mediated diseases. *PLoS One* 5:e15384.
- Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. 2005. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 438:937-945.
- Cowin AJ, Kallincos N, Hatzirodos N, Robertson JG, Pickering KJ, Couper J, Belford DA. 2001. Hepatocyte growth factor and macrophage-stimulating protein are upregulated during excisional wound repair in rats. *Cell Tissue Res* 306:239-250.
- Crepaldi T, Gautreau A, Comoglio PM, Louvard D, Arpin M. 1997. Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *J Cell Biol* 138:423-434.
- Curran J. 2001. Topical chemical carcinogen treatment in mice. *Methods Mol Biol* 174:391-399.
- Chan-Ling T, McLeod DS, Hughes S, Baxter L, Chu Y, Hasegawa T, Luffy GA. 2004. Astrocyte-endothelial cell relationships during human retinal vascular development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2020-2032.
- Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. 2000. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14608-14613.
- Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. 2009. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 457:887-891.
- Chin KF, Greenman J, Reusch P, Gardiner E, Marme D, Monson JR. 2003. Vascular endothelial growth factor and soluble Tie-2 receptor in colorectal cancer: associations with disease recurrence. *Eur J Surg Oncol* 29:497-505.
- Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, Wehland J, Birchmeier C, Birchmeier W. 2007. c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol* 177:151-162.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. 1998. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125:725-732.
- D'Amico G, Korhonen EA, Waltari M, Saharinen P, Laakkonen P, Alitalo K. 2010. Loss of endothelial Tie1 receptor impairs lymphatic vessel development-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:207-209.
- Dai C, Huh CG, Thorgeirsson SS, Liu Y. 2005. Beta-cell-specific ablation of the hepatocyte growth factor receptor results in reduced islet size, impaired insulin secretion, and glucose intolerance. *Am J Pathol* 167:429-436.
- Dales JP, Garcia S, Bonnier P, Duffaud F, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Lavaut MN, Allasia C, Charpin C. 2003. Tie2/Tek expression in breast carcinoma: correlations of immunohistochemical assays and long-term follow-up in a series of 909 patients. *Int J Oncol* 22:391-397.
- Daly C, Pasnikowski E, Burova E, Wong V, Aldrich TH, Griffiths J, Ioffe E, Daly TJ, Fandl JP, Papadopoulos N, McDonald DM, Thurston G, Yancopoulos GD, Rudge JS. 2006. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15491-15496.
- Danilkovitch-Miagkova A, Zbar B. 2002. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J Clin Invest* 109:863-867.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87:1161-1169.
- Davis S, Papadopoulos N, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Huang T, Kovac L, Xu A, Leidich R, Radziejewska E, Rafique A, Goldberg J, Jain V, Bailey K, Karow M, Fandl J, Samuelsson SJ, Ioffe E, Rudge JS, Daly TJ, Radziejewski C, Yancopoulos GD. 2003. Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nat Struct Biol* 10:38-44.
- de Lange WJ, Halabi CM, Beyer AM, Sigmund CD. 2008. Germ Line Activation of the Tie2 and SMMHC Promoters Causes Non-Cell Specific Deletion of Floxed Alleles. *Physiol Genomics*.

- De Palma M, Murdoch C, Venneri MA, Naldini L, Lewis CE. 2007. Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol* 28:519-524.
- De Palma M, Naldini L. 2009. Tie2-expressing monocytes (TEMs): novel targets and vehicles of anticancer therapy? *Biochim Biophys Acta* 1796:5-10.
- De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, Naldini L. 2005. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8:211-226.
- De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L. 2003. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* 9:789-795.
- Deb A, Patterson C. 2010. Hard luck stories: the reality of endothelial progenitor cells continues to fall short of the promise. *Circulation* 121:850-852.
- Deliolanis NC, Kasmieh R, Wurdinger T, Tannous BA, Shah K, Ntziachristos V. 2008. Performance of the red-shifted fluorescent proteins in deep-tissue molecular imaging applications. *J Biomed Opt* 13:044008.
- Dieguez-Hurtado R, Martin J, Martinez-Corral I, Martinez MD, Megias D, Olmeda D, Ortega S. 2011. A Cre-reporter transgenic mouse expressing the far-red fluorescent protein Katushka. *Genesis* 49:36-45.
- Ding S, Merkulova-Rainon T, Han ZC, Tobelem G. 2003. HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis in vitro. *Blood* 101:4816-4822.
- Dong G, Lee TL, Yeh NT, Geoghegan J, Van Waes C, Chen Z. 2004. Metastatic squamous cell carcinoma cells that overexpress c-Met exhibit enhanced angiogenesis factor expression, scattering and metastasis in response to hepatocyte growth factor. *Oncogene* 23:6199-6208.
- Draffin JE, McFarlane S, Hill A, Johnston PG, Waugh DJ. 2004. CD44 potentiates the adherence of metastatic prostate and breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Cancer Res* 64:5702-5711.
- Duan B, Cheng L, Gao Y, Yin FX, Su GH, Shen QY, Liu K, Hu X, Liu X, Li GP. 2012. Silencing of fat-1 transgene expression in sheep may result from hypermethylation of its driven cytomegalovirus (CMV) promoter. *Theriogenology*.
- Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. 1995. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* 203:80-92.
- Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML. 1994. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* 8:1897-1909.
- Eklund L, Olsen BR. 2006. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* 312:630-641.
- Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. 2007. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem* 42:115-170.
- Ergun S, Hohn HP, Kilic N, Singer BB, Tilki D. 2008. Endothelial and hematopoietic progenitor cells (EPCs and HPCs): hand in hand fate determining partners for cancer cells. *Stem Cell Rev* 4:169-177.
- Factor VM, Seo D, Ishikawa T, Kaposi-Novak P, Marquardt JU, Andersen JB, Conner EA, Thorgeirsson SS. 2010. Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice. *PLoS One* 5.
- Fathers KE, Stone CM, Minhas K, Marriott JJ, Greenwood JD, Dumont DJ, Coomber BL. 2005. Heterogeneity of Tie2 expression in tumor microcirculation: influence of cancer type, implantation site, and response to therapy. *Am J Pathol* 167:1753-1762.
- Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Laboudie P, Fons P, Mandron M, Herault JP, Neufeld G, Savi P, Herbert JM, Bono F. 2006. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* 108:1243-1250.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. 1997. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237:752-757.
- Feistritzer C, Mosheimer BA, Sturn DH, Bijuklic K, Patsch JR, Wiedermann CJ. 2004. Expression and function of the angiopoietin receptor Tie-2 in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 114:1077-1084.
- Filonov GS, Piatkevich KD, Ting LM, Zhang J, Kim K, Verkhusha VV. 2011. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 29:757-761.
- Folkman J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186.
- Folkman J. 1974. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 19:331-358.
- Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1:27-31.
- Folkman J. 2007a. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6:273-286.
- Folkman J. 2007b. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *J Pediatr Surg* 42:1-11.
- Folkman J, Ryeom S. 2005. Is oncogene addiction angiogenesis-dependent? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:389-397.

- Follenzi A, Bakovic S, Gual P, Stella MC, Longati P, Comoglio PM. 2000. Cross-talk between the proto-oncogenes Met and Ron. *Oncogene* 19:3041-3049.
- Forde A, Constien R, Grone HJ, Hammerling G, Arnold B. 2002. Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements. *Genesis* 33:191-197.
- Fraisl P, Baes M, Carmeliet P. 2008. Hungry for blood vessels: linking metabolism and angiogenesis. *Dev Cell* 14:313-314.
- Friedlander M, Dorrell MI, Ritter MR, Marchetti V, Moreno SK, El-Kalay M, Bird AC, Banin E, Aguilar E. 2007. Progenitor cells and retinal angiogenesis. *Angiogenesis* 10:89-101.
- Fruttiger M. 2007. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10:77-88.
- Fukata S, Inoue K, Kamada M, Kawada C, Furihata M, Ohtsuki Y, Shuin T. 2005. Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ-specific metastasis of renal cell carcinoma. *Cancer* 103:931-942.
- Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, Mochizuki N. 2008. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol* 10:513-526.
- Furr BJ, Jordan VC. 1984. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther* 25:127-205.
- Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte MH, Jackson D, Suri C, Campochiaro PA, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. 2002. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 3:411-423.
- Gannon M, Shiota C, Postic C, Wright CV, Magnuson M. 2000. Analysis of the Cre-mediated recombination driven by rat insulin promoter in embryonic and adult mouse pancreas. *Genesis* 26:139-142.
- Garg S, Oran AE, Hon H, Jacob J. 2004. The hybrid cytomegalovirus enhancer/chicken beta-actin promoter along with woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances the protective efficacy of DNA vaccines. *J Immunol* 173:550-558.
- Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM. 2008. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27:85-94.
- Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G. 2012. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer* 12:89-103.
- Gherardi E, Hartmann G, Hepple J, Chirgadze D, Srinivasan N, Blundell T. 1997. Domain structure of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF). *Ciba Found Symp* 212:84-93; discussion 93-104.
- Gherardi E, Sandin S, Petoukhov MV, Finch J, Youles ME, Ofverstedt LG, Miguel RN, Blundell TL, Vande Woude GF, Skoglund U, Svergun DI. 2006. Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4046-4051.
- Gherardi E, Stoker M. 1990. Hepatocytes and scatter factor. *Nature* 346:228.
- Gherardi E, Youles ME, Miguel RN, Blundell TL, Iamlele L, Gough J, Bandyopadhyay A, Hartmann G, Butler PJ. 2003. Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12039-12044.
- Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM. 2002. The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol* 4:720-724.
- Gothelf A, Eriksen J, Hojman P, Gehl J. 2010. Duration and level of transgene expression after gene electrotransfer to skin in mice. *Gene Ther*.
- Gothert JR, Gustin SE, van Eekelen JA, Schmidt U, Hall MA, Jane SM, Green AR, Gottgens B, Izon DJ, Begley CG. 2004. Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood* 104:1769-1777.
- Gotte M, Kersting C, Radke I, Kiesel L, Wulfig P. 2007. An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res* 9:R8.
- Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P, Rosen EM. 1993. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1937-1941.
- Greenberg DA, Jin K. 2005. From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 438:954-959.
- Groothuis PG. 2005. Angiogenesis and vascular remodelling in female reproductive organs. *Angiogenesis* 8:87-88.
- Gu H, Neel BG. 2003. The "Gab" in signal transduction. *Trends Cell Biol* 13:122-130.
- Gustafsson E, Brakebusch C, Hietanen K, Fassler R. 2001. Tie-1-directed expression of Cre recombinase in endothelial cells of embryoid bodies and transgenic mice. *J Cell Sci* 114:671-676.
- Ha X, Li Y, Lao M, Yuan B, Wu CT. 2003. Effect of human hepatocyte growth factor on promoting wound healing and preventing scar formation by adenovirus-mediated gene transfer. *Chin Med J (Engl)* 116:1029-1033.
- Hamaguchi I, Huang XL, Takakura N, Tada J, Yamaguchi Y, Kodama H, Suda T. 1999. In vitro hematopoietic and endothelial cell development from cells expressing TEK receptor in murine aorta-gonad-mesonephros region. *Blood* 93:1549-1556.

- Hamaguchi I, Morisada T, Azuma M, Murakami K, Kuramitsu M, Mizukami T, Ohbo K, Yamaguchi K, Oike Y, Dumont DJ, Suda T. 2006. Loss of Tie2 receptor compromises embryonic stem cell-derived endothelial but not hematopoietic cell survival. *Blood* 107:1207-1213.
- Hamilton DL, Abremski K. 1984. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* 178:481-486.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
- Hartmann G, Prospero T, Brinkmann V, Ozcelik C, Winter G, Hepple J, Batley S, Bladt F, Sachs M, Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E. 1998. Engineered mutants of HGF/SF with reduced binding to heparan sulphate proteoglycans, decreased clearance and enhanced activity in vivo. *Curr Biol* 8:125-134.
- Hayashi S, Lewis P, Pevny L, McMahon AP. 2002. Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain. *Gene Expr Patterns* 2:93-97.
- Hayashi Y, Toda K, Saibara T, Okada T, Enzan H. 2006. Assessment of anti-estrogenic activity of tamoxifen in transgenic mice expressing an enhanced green fluorescent protein gene regulated by estrogen response element. *Biochim Biophys Acta* 1760:164-171.
- Heideman DA, van Beusechem VW, Bloemena E, Snijders PJ, Craanen ME, Offerhaus GJ, Derksen PW, de Bruin M, Witlox MA, Molenaar B, Meijer CJ, Gerritsen WR. 2004. Suppression of tumor growth, invasion and angiogenesis of human gastric cancer by adenovirus-mediated expression of NK4. *J Gene Med* 6:317-327.
- Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. 1997. Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3:177-182.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. 2003. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348:593-600.
- Hillen F, Kaijzel EL, Castermans K, oude Egbrink MG, Lowik CW, Griffioen AW. 2008. A transgenic Tie2-GFP athymic mouse model; a tool for vascular biology in xenograft tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 368:364-367.
- Hiscox S, Jiang WG. 1999. Association of the HGF/SF receptor, c-met, with the cell-surface adhesion molecule, E-cadherin, and catenins in human tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 261:406-411.
- Hojman P, Eriksen J, Gehl J. 2009. In Vivo Imaging of Far-red Fluorescent Proteins after DNA Electrotransfer to Muscle Tissue. *Biol Proced Online*.
- Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. 1995. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1:149-153.
- Hsu HC, Ema H, Osawa M, Nakamura Y, Suda T, Nakauchi H. 2000. Hematopoietic stem cells express Tie-2 receptor in the murine fetal liver. *Blood* 96:3757-3762.
- Hu B, Jarzynka MJ, Guo P, Imanishi Y, Schlaepfer DD, Cheng SY. 2006. Angiopoietin 2 induces glioma cell invasion by stimulating matrix metalloprotease 2 expression through the  $\alpha$ v $\beta$ 1 integrin and focal adhesion kinase signaling pathway. *Cancer Res* 66:775-783.
- Huang H, Bhat A, Woodnutt G, Lappe R. 2010. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer* 10:575-585.
- Hughes S, Yang H, Chan-Ling T. 2000. Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1217-1228.
- Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. 2004. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4477-4482.
- Huynh H, Zheng J, Umikawa M, Silvany R, Xie XJ, Wu CJ, Holzenberger M, Wang Q, Zhang CC. Components of the hematopoietic compartments in tumor stroma and tumor-bearing mice. *PLoS One* 6:e18054.
- Ilijn K, Petrova TV, Veikkola T, Kumar V, Poutanen M, Alitalo K. 2002. A fluorescent Tie1 reporter allows monitoring of vascular development and endothelial cell isolation from transgenic mouse embryos. *Faseb J* 16:1764-1774.
- Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D. 1999. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 27:4324-4327.
- Iwama A, Hamaguchi I, Hashiyama M, Murayama Y, Yasunaga K, Suda T. 1993. Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195:301-309.
- Jain RK. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9:685-693.
- Jeffers M, Rong S, Anver M, Vande Woude GF. 1996. Autocrine hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling induces transformation and the invasive/metastatic phenotype in C127 cells. *Oncogene* 13:853-856.
- Ji Y, Hayashi K, Amoh Y, Tsuji K, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Bouvet M, Hoffman RM. 2007. The camptothecin derivative CPT-11 inhibits angiogenesis in a dual-color imageable orthotopic metastatic nude mouse model of human colon cancer. *Anticancer Res* 27:713-718.
- Jiang WG, Hiscox SE, Parr C, Martin TA, Matsumoto K, Nakamura T, Mansel RE. 1999. Antagonistic effect of NK4, a novel hepatocyte growth factor variant, on in vitro angiogenesis of human vascular endothelial cells. *Clin Cancer Res* 5:3695-3703.



- Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K. 2001. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:257-267.
- Jorgensen MC, Ahnfelt-Ronne J, Hald J, Madsen OD, Serup P, Hecksher-Sorensen J. 2007. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev* 28:685-705.
- Judson MC, Eagleson KL, Wang L, Levitt P. 2010. Evidence of cell-nonautonomous changes in dendrite and dendritic spine morphology in the met-signaling-deficient mouse forebrain. *J Comp Neurol* 518:4463-4478.
- Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. 1995. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3566-3570.
- Kajiya K, Hirakawa S, Ma B, Drinnenberg I, Detmar M. 2005. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *Embo J* 24:2885-2895.
- Keough MP, Hayes CS, DeFeo K, Gilmour SK. 2010. Elevated epidermal ornithine decarboxylase activity suppresses contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 131:158-166.
- Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. 2008. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *Embo J* 27:522-534.
- Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. 2001. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* 230:230-242.
- Kishimoto J, Ehama R, Ge Y, Kobayashi T, Nishiyama T, Detmar M, Burgeson RE. 2000. In vivo detection of human vascular endothelial growth factor promoter activity in transgenic mouse skin. *Am J Pathol* 157:103-110.
- Kobayashi H, Lin PC. 2005. Angiopoietin/Tie2 signaling, tumor angiogenesis and inflammatory diseases. *Front Biosci* 10:666-674.
- Kobayashi S, Yoshida K, Ohshima T, Esumi N, Paralkar VM, Wistow GJ, Kulkarni AB. 1998. DNA sequence motifs are associated with aberrant homologous recombination in the mouse macrophage migration inhibitory factor (Mif) locus. *Gene* 215:85-92.
- Kogata N, Arai Y, Pearson JT, Hashimoto K, Hidaka K, Koyama T, Somekawa S, Nakaoka Y, Ogawa M, Adams RH, Okada M, Mochizuki N. 2006. Cardiac ischemia activates vascular endothelial cadherin promoter in both preexisting vascular cells and bone marrow cells involved in neovascularization. *Circ Res* 98:897-904.
- Korhonen H, Fisslthaler B, Moers A, Wirth A, Habermehl D, Wieland T, Schutz G, Wettschureck N, Fleming I, Offermanns S. 2009. Anaphylactic shock depends on endothelial Gq/G11. *J Exp Med* 206:411-420.
- Korhonen J, Lahtinen I, Halmekyto M, Alhonen L, Janne J, Dumont D, Alitalo K. 1995. Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo. *Blood* 86:1828-1835.
- Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. 2000. HGF/NK4, a four-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, is an angiogenesis inhibitor that suppresses tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Res* 60:6737-6743.
- Kubota T, Taiyoh H, Matsumura A, Murayama Y, Ichikawa D, Okamoto K, Fujiwara H, Ikoma H, Nakanishi M, Kikuchi S, Ochiai T, Sakakura C, Kokuba Y, Sonoyama T, Suzuki Y, Matsumoto K, Nakamura T, Otsuji E. 2009. Gene transfer of NK4, an angiogenesis inhibitor, induces CT26 tumor regression via tumor-specific T lymphocyte activation. *Int J Cancer* 125:2879-2886.
- Kuhnen C, Muehlberger T, Honsel M, Tolnay E, Steinau HU, Muller KM. 2003. Impact of c-Met expression on angiogenesis in soft tissue sarcomas: correlation to microvessel-density. *J Cancer Res Clin Oncol* 129:415-422.
- Lee HJ, Koh GY. 2003. Shear stress activates Tie2 receptor tyrosine kinase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 304:399-404.
- Lemieux C, Maliba R, Favier J, Theoret JF, Merhi Y, Sirois MG. 2005. Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood* 105:1523-1530.
- Lesko E, Majka M. 2008. The biological role of HGF-MET axis in tumor growth and development of metastasis. *Front Biosci* 13:1271-1280.
- Lewis C, Murdoch C. 2005. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 167:627-635.
- Lewis CE, De Palma M, Naldini L. 2007. Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res* 67:8429-8432.
- Li LY, Barlow KD, Metheny-Barlow LJ. 2005. Angiopoietins and Tie2 in health and disease. *Pediatr Endocrinol Rev* 2:399-408.
- Lin MZ, McKeown MR, Ng HL, Aguilera TA, Shaner NC, Campbell RE, Adams SR, Gross LA, Ma W, Alber T, Tsien RY. 2009. Autofluorescent proteins with excitation in the optical window for intravital imaging in mammals. *Chem Biol* 16:1169-1179.
- Lingen MW. 2001. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 125:67-71.
- Liu F, Schaphorst KL, Verin AD, Jacobs K, Birukova A, Day RM, Bogatcheva N, Bottaro DP, Garcia JG. 2002. Hepatocyte growth factor enhances endothelial cell barrier function and cortical cytoskeletal rearrangement: potential role of glycogen synthase kinase-3beta. *Faseb J* 16:950-962.

- Liu X, Newton RC, Scherle PA. 2010. Developing c-MET pathway inhibitors for cancer therapy: progress and challenges. *Trends Mol Med* 16:37-45.
- Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. 2002. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11205-11210.
- Lock LS, Royal I, Naujokas MA, Park M. 2000. Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals Grb2-dependent and -independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 275:31536-31545.
- Lyons SK, Meuwissen R, Krimpenfort P, Berns A. 2003. The generation of a conditional reporter that enables bioluminescence imaging of Cre/loxP-dependent tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 63:7042-7046.
- Ma H, Calderon TM, Fallon JT, Berman JW. 2002. Hepatocyte growth factor is a survival factor for endothelial cells and is expressed in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 164:79-87.
- Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R. 2003. c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev* 22:309-325.
- Ma PC, Tretiakova MS, MacKinnon AC, Ramnath N, Johnson C, Dietrich S, Seiwert T, Christensen JG, Jagadeeswaran R, Krausz T, Vokes EE, Husain AN, Salgia R. 2008. Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 47:1025-1037.
- Macdonald PR, Progijs P, Ciani B, Patel S, Mayer U, Steinmetz MO, Kammerer RA. 2006. Structure of the extracellular domain of Tie receptor tyrosine kinases and localization of the angiopoietin-binding epitope. *J Biol Chem* 281:28408-28414.
- Maina F, Casagrande F, Audero E, Simeone A, Comoglio PM, Klein R, Ponzetto C. 1996. Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 87:531-542.
- Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R. 1997. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev* 11:3341-3350.
- Maina F, Pante G, Helmbacher F, Andres R, Porthin A, Davies AM, Ponzetto C, Klein R. 2001. Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes. *Mol Cell* 7:1293-1306.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277:55-60.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. 1999. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155:739-752.
- Martinez-Corral I, Olmeda D, Dieguez-Hurtado R, Tammela T, Alitalo K, Ortega S. 2012. In vivo imaging of lymphatic vessels in development, wound healing, inflammation, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:6223-6228.
- Martins GJ, Shahrokh M, Powell EM. 2011. Genetic disruption of Met signaling impairs GABAergic striatal development and cognition. *Neuroscience* 176:199-209.
- Mecha Disassa N, Styp-Rekowska B, Hinz B, Da Silva-Azevedo L, Pries AR, Zakrzewicz A. 2008. Differential expression of VEGFA, TIE2, and ANG2 but not ADAMTS1 in rat mesenteric microvascular arteries and veins. *Physiol Res*.
- Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, Simpson DA, Stitt AW. 2010. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med Genomics* 3:18.
- Mellado-Gil J, Rosa TC, Demirci C, Gonzalez-Pertusa JA, Velazquez-Garcia S, Ernst S, Valle S, Vasavada RC, Stewart AF, Alonso LC, Garcia-Ocana A. 2010. Disruption of hepatocyte growth factor/c-Met signaling enhances pancreatic beta-cell death and accelerates the onset of diabetes. *Diabetes* 60:525-536.
- Merkulova-Rainon T, England P, Ding S, Demerens C, Tobelem G. 2003. The N-terminal domain of hepatocyte growth factor inhibits the angiogenic behavior of endothelial cells independently from binding to the c-met receptor. *J Biol Chem* 278:37400-37408.
- Metzger D, Chambon P. 2001. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24:71-80.
- Mi J, Sarraf-Yazdi S, Zhang X, Cao Y, Dewhirst MW, Kontos CD, Li CY, Clary BM. 2006. A comparison of antiangiogenic therapies for the prevention of liver metastases. *J Surg Res* 131:97-104.
- Mine S, Fujisaki T, Kawahara C, Tabata T, Iida T, Yasuda M, Yoneda T, Tanaka Y. 2003. Hepatocyte growth factor enhances adhesion of breast cancer cells to endothelial cells in vitro through up-regulation of CD44. *Exp Cell Res* 288:189-197.
- Modarai B, Burnand KG, Sawyer B, Smith A. 2005. Endothelial progenitor cells are recruited into resolving venous thrombi. *Circulation* 111:2645-2653.
- Moldovan NI. 2003. Current priorities in the research of circulating pre-endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 522:1-8.
- Monvoisin A, Alva JA, Hofmann JJ, Zovein AC, Lane TF, Iruela-Arispe ML. 2006. VE-cadherin-CreERT2 transgenic mouse: a model for inducible recombination in the endothelium. *Dev Dyn* 235:3413-3422.

- Morisada T, Oike Y, Yamada Y, Urano T, Akao M, Kubota Y, Maekawa H, Kimura Y, Ohmura M, Miyamoto T, Nozawa S, Koh GY, Alitalo K, Suda T. 2005. Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation. *Blood* 105:4649-4656.
- Motoike T, Loughna S, Perens E, Roman BL, Liao W, Chau TC, Richardson CD, Kawate T, Kuno J, Weinstein BM, Stainier DY, Sato TN. 2000. Universal GFP reporter for the study of vascular development. *Genesis* 28:75-81.
- Muñoz-Chapuli R, Carmona R, Guadix JA, Macias D, Perez-Pomares JM. 2005. The origin of the endothelial cells: an evo-devo approach for the invertebrate/vertebrate transition of the circulatory system. *Evol Dev* 7:351-358.
- Murdoch C, Tazzyman S, Webster S, Lewis CE. 2007. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol* 178:7405-7411.
- Nagy A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.
- Nagy A. 2003. Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. x, 764 p. p.
- Nakachi I, Naoki K, Soejima K, Kawada I, Watanabe H, Yasuda H, Nakayama S, Yoda S, Satomi R, Ikemura S, Terai H, Sato T, Ishizaka A. 2010. The combination of multiple receptor tyrosine kinase inhibitor and mammalian target of rapamycin inhibitor overcomes erlotinib resistance in lung cancer cell lines through c-Met inhibition. *Mol Cancer Res* 8:1142-1151.
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. 1989. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342:440-443.
- Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, et al. 1991. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *Embo J* 10:2867-2878.
- Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. 2006. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle* 5:1779-1787.
- Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, Hedrich H, Boehm T. 1994. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 372:103-107.
- Neuss S, Becher E, Woltje M, Tietze L, Jahnke-Dechent W. 2004. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells* 22:405-414.
- Nguyen VP, Chen SH, Trinh J, Kim H, Coomber BL, Dumont DJ. 2007. Differential response of lymphatic, venous and arterial endothelial cells to angiopoietin-1 and angiopoietin-2. *BMC Cell Biol* 8:10.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193-199.
- Noonan DM, Benelli R, Albin A. 2007. Angiogenesis and cancer prevention: a vision. *Recent Results Cancer Res* 174:219-224.
- Nowak G, Karrar A, Holmen C, Nava S, Uzunel M, Hulténby K, Sumitran-Holgersson S. 2004. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization. *Circulation* 110:3699-3707.
- Okazaki T, Ni A, Ayeni OA, Baluk P, Yao LC, Vossmeier D, Zischinsky G, Zahn G, Knolle J, Christner C, McDonald DM. 2009. alpha5beta1 Integrin blockade inhibits lymphangiogenesis in airway inflammation. *Am J Pathol* 174:2378-2387.
- Olaku V, Matzke A, Mitchell C, Hasenauer S, Sakkaravarthi A, Pace G, Ponta H, Orian-Rousseau V. 2011. c-Met recruits ICAM-1 as a coreceptor to compensate for the loss of CD44 in Cd44 null mice. *Mol Biol Cell* 22:2777-2786.
- Ollinger R, Wang H, Yamashita K, Wegiel B, Thomas M, Margreiter R, Bach FH. 2007. Therapeutic applications of bilirubin and biliverdin in transplantation. *Antioxid Redox Signal* 9:2175-2185.
- Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. 2002. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* 16:3074-3086.
- Otsuka T, Jakubczak J, Vieira W, Bottaro DP, Breckenridge D, Larochelle WJ, Merlino G. 2000. Disassociation of met-mediated biological responses in vivo: the natural hepatocyte growth factor/scatter factor splice variant NK2 antagonizes growth but facilitates metastasis. *Mol Cell Biol* 20:2055-2065.
- Overhaus M, Moore BA, Barbato JE, Behrendt FF, Doering JG, Bauer AJ. 2006. Biliverdin protects against polymicrobial sepsis by modulating inflammatory mediators. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G695-703.
- Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. 2009. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15:220-231.
- Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G. 1987. Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:6379-6383.
- Partanen J, Armstrong E, Makela TP, Korhonen J, Sandberg M, Renkonen R, Knuutila S, Huebner K, Alitalo K. 1992. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol Cell Biol* 12:1698-1707.

- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95:952-958.
- Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. 2003. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 3:347-361.
- Peruzzi B, Bottaro DP. 2006. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 12:3657-3660.
- Peters KG, Kontos CD, Lin PC, Wong AL, Rao P, Huang L, Dewhirst MW, Sankar S. 2004. Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature. *Recent Prog Horm Res* 59:51-71.
- Pitulescu ME, Schmidt I, Benedito R, Adams RH. 2010. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc* 5:1518-1534.
- Porter J. 2010. Small molecule c-Met kinase inhibitors: a review of recent patents. *Expert Opin Ther Pat* 20:159-177.
- Puri MC, Bernstein A. 2003. Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12753-12758.
- Puri N, Khramtsov A, Ahmed S, Nallasura V, Hetzel JT, Jagadeeswaran R, Karczmar G, Salgia R. 2007. A selective small molecule inhibitor of c-Met, PHA665752, inhibits tumorigenicity and angiogenesis in mouse lung cancer xenografts. *Cancer Res* 67:3529-3534.
- Qu X, Tompkins K, Batts LE, Puri M, Baldwin S. 2010. Abnormal embryonic lymphatic vessel development in Tie1 hypomorphic mice. *Development* 137:1285-1295.
- Risau W, Flamme I. 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73-91.
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM. 2000. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25:139-140.
- Rosen EM, Carley W, Goldberg ID. 1990. Scatter factor regulates vascular endothelial cell motility. *Cancer Invest* 8:647-650.
- Rosen EM, Goldberg ID. 1995. Scatter factor and angiogenesis. *Adv Cancer Res* 67:257-279.
- Rubin JS, Day RM, Breckenridge D, Atabey N, Taylor WG, Stahl SJ, Wingfield PT, Kaufman JD, Schwall R, Bottaro DP. 2001. Dissociation of heparan sulfate and receptor binding domains of hepatocyte growth factor reveals that heparan sulfate-c-met interaction facilitates signaling. *J Biol Chem* 276:32977-32983.
- Sachs M, Brohmann H, Zechner D, Muller T, Hulsken J, Walther I, Schaeper U, Birchmeier C, Birchmeier W. 2000. Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. *J Cell Biol* 150:1375-1384.
- Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, Wirkkala R, Anisimov A, Winderlich M, Nottebaum A, Vestweber D, Deutsch U, Koh GY, Olsen BR, Alitalo K. 2008. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol* 10:527-537.
- Saint-Geniez M, D'Amore PA. 2004. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol* 48:1045-1058.
- Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K. 2009. Angioinhibitory action of NK4 involves impaired extracellular assembly of fibronectin mediated by perlecan-NK4 association. *J Biol Chem* 284:22491-22499.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Third ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. 1995. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376:70-74.
- Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. 2005. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci* 118:771-780.
- Schlaeger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U, Sato TN. 1997. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3058-3063.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C. 1995. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373:699-702.
- Schnurch H, Risau W. 1993. Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development* 119:957-968.
- Schwall RH, Chang LY, Godowski PJ, Kahn DW, Hillan KJ, Bauer KD, Zioncheck TF. 1996. Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2. *J Cell Biol* 133:709-718.
- Sengupta S, Gherardi E, Sellers LA, Wood JM, Sasisekharan R, Fan TP. 2003a. Hepatocyte growth factor/scatter factor can induce angiogenesis independently of vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:69-75.
- Sengupta S, Sellers LA, Cindrova T, Skepper J, Gherardi E, Sasisekharan R, Fan TP. 2003b. Cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit hepatocyte growth factor/scatter factor-induced angiogenesis. *Cancer Res* 63:8351-8359.

- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22:1567-1572.
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2:905-909.
- Shcherbo D, Merzlyak EM, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Ermakova GV, Solovieva EA, Lukyanov KA, Bogdanova EA, Zaraisky AG, Lukyanov S, Chudakov DM. 2007. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods* 4:741-746.
- Shcherbo D, Shemiakina, II, Ryabova AV, Luker KE, Schmidt BT, Souslova EA, Gorodnicheva TV, Strukova L, Shidlovskiy KM, Britanova OV, Zaraisky AG, Lukyanov KA, Loschenov VB, Luker GD, Chudakov DM. 2010. Near-infrared fluorescent proteins. *Nat Methods* 7:827-829.
- Shim WS, Ho IA, Wong PE. 2007. Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res* 5:655-665.
- Shirakawa K, Kobayashi H, Heike Y, Kawamoto S, Brechbiel MW, Kasumi F, Iwanaga T, Konishi F, Terada M, Wakasugi H. 2002. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res* 62:560-566.
- Shojaei F, Lee JH, Simmons BH, Wong A, Esparza CO, Plumlee PA, Feng J, Stewart AE, Hu-Lowe DD, Christensen JG. 2010. HGF/c-Met Acts as an Alternative Angiogenic Pathway in Sunitinib-Resistant Tumors. *Cancer Res*.
- Shu X, Royant A, Lin MZ, Aguilera TA, Lev-Ram V, Steinbach PA, Tsien RY. 2009. Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science* 324:804-807.
- Silvagno F, Follenzi A, Arese M, Prat M, Giraudo E, Gaudino G, Camussi G, Comoglio PM, Bussolino F. 1995. In vivo activation of met tyrosine kinase by heterodimeric hepatocyte growth factor molecule promotes angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1857-1865.
- Sleeman JP, Krishnan J, Kirkin V, Baumann P. 2001. Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail? *Microsc Res Tech* 55:61-69.
- Sorensen I, Adams RH, Gossler A. 2009. DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. *Blood* 113:5680-5688.
- Soriano P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21:70-71.
- St Hill CA. 2011. Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis. *Front Biosci* 17:3233-3251.
- Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, Hua J, Lofqvist C, Hellstrom A, Smith LE. 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:2813-2826.
- Staite ND, Justen JM, Sly LM, Beaudet AL, Bullard DC. 1996. Inhibition of delayed-type contact hypersensitivity in mice deficient in both E-selectin and P-selectin. *Blood* 88:2973-2979.
- Stamatas GN, Southall M, Kollias N. 2006. In vivo monitoring of cutaneous edema using spectral imaging in the visible and near infrared. *J Invest Dermatol* 126:1753-1760.
- Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. 1987. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 327:239-242.
- Strack RL, Hein B, Bhattacharyya D, Hell SW, Keenan RJ, Glick BS. 2009. A rapidly maturing far-red derivative of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *Biochemistry* 48:8279-8281.
- Sturn DH, Feistritz C, Mosheimer BA, Djanani A, Bijuklic K, Patsch JR, Wiedermann CJ. 2005. Angiopoietin affects neutrophil migration. *Microcirculation* 12:393-403.
- Suetsugu A, Hassanein MK, Reynoso J, Osawa Y, Nagaki M, Moriwaki H, Saji S, Bouvet M, Hoffman RM. 2012. The cyan fluorescent protein nude mouse as a host for multicolor-coded imaging models of primary and metastatic tumor microenvironments. *Anticancer Res* 32:31-38.
- Sulpice E, Plouet J, Berge M, Allanic D, Tobelem G, Merkulova-Rainon T. 2008. Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Blood* 111:2036-2045.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87:1171-1180.
- Suzuki Y, Sakai K, Ueki J, Xu Q, Nakamura T, Shimada H, Matsumoto K. 2010. Inhibition of Met/HGF receptor and angiogenesis by NK4 leads to suppression of tumor growth and migration in malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer* 127:1948-1957.
- Tait CR, Jones PF. 2004. Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *J Pathol* 204:1-10.
- Takahashi Y, Mai M. 2005. Antibody against vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibits angiogenic switch and liver metastasis in orthotopic xenograft model with site-dependent expression of VEGF. *J Exp Clin Cancer Res* 24:237-243.
- Takakura N, Huang XL, Naruse T, Hamaguchi I, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Suda T. 1998. Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. *Immunity* 9:677-686.
- Tammela T, Saaristo A, Lohela M, Morisada T, Tornberg J, Norrmen C, Oike Y, Pajusola K, Thurston G, Suda T, Yla-Herttuala S, Alitalo K. 2005. Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood* 105:4642-4648.

- Tang Y, Harrington A, Yang X, Friesel RE, Liaw L. 2010. The contribution of the Tie2+ lineage to primitive and definitive hematopoietic cells. *Genesis* 48:563-567.
- Teng PI, Dichiaro MR, Komuves LG, Abe K, Quertermous T, Topper JN. 2002. Inducible and selective transgene expression in murine vascular endothelium. *Physiol Genomics* 11:99-107.
- Theis M, de Wit C, Schlaeger TM, Eckardt D, Kruger O, Doring B, Risau W, Deutsch U, Pohl U, Willecke K. 2001. Endothelium-specific replacement of the connexin43 coding region by a lacZ reporter gene. *Genesis* 29:1-13.
- Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. 1999. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286:2511-2514.
- Tomlinson A, Ferguson MW. 2003. Wound healing: a model of dermal wound repair. *Methods Mol Biol* 225:249-260.
- Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. 2000. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc* 5:40-46.
- Tran Cao HS, Reynoso J, Yang M, Kimura H, Kaushal S, Snyder CS, Hoffman RM, Bouvet M. 2009. Development of the transgenic cyan fluorescent protein (CFP)-expressing nude mouse for "Technicolor" cancer imaging. *J Cell Biochem* 107:328-334.
- Tromberg BJ, Shah N, Lanning R, Cerussi A, Espinoza J, Pham T, Svaasand L, Butler J. 2000. Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia* 2:26-40.
- Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. 2001. A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 107:643-654.
- Trusolino L, Comoglio PM. 2002. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer* 2:289-300.
- Van Belle E, Witzensbichler B, Chen D, Silver M, Chang L, Schwall R, Isner JM. 1998. Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation* 97:381-390.
- Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere SJ, Colpaert CG, Turley H, Harris AL, van Dam P, Dirix LY, Vermeulen PB, Van Marck EA. 2005. Angiogenesis and hypoxia in lymph node metastases is predicted by the angiogenesis and hypoxia in the primary tumour in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 93:1128-1136.
- van Haperen R, Cheng C, Mees BM, van Deel E, de Waard M, van Damme LC, van Gent T, van Aken T, Krams R, Duncker DJ, de Crom R. 2003. Functional expression of endothelial nitric oxide synthase fused to green fluorescent protein in transgenic mice. *Am J Pathol* 163:1677-1686.
- Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, Pucci F, Scielzo C, Zonari E, Mazziere R, Doglioni C, Naldini L. 2007. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 109:5276-5285.
- Vooijs M, Jonkers J, Berns A. 2001. A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep* 2:292-297.
- Wang MH, Padhye SS, Guin S, Ma Q, Zhou YQ. 2010. Potential therapeutics specific to c-MET/ROK receptor tyrosine kinases for molecular targeting in cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin* 31:1181-1188.
- Wang R, Ferrell LD, Faouzi S, Maher JJ, Bishop JM. 2001. Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J Cell Biol* 153:1023-1034.
- Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Padiaditakis P, Johnson C, Bell A, Michalopoulos GK, Zarnegar R. 2002. A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell* 9:411-421.
- Wang Y, Iyer M, Annala A, Wu L, Carey M, Gambhir SS. 2006. Noninvasive indirect imaging of vascular endothelial growth factor gene expression using bioluminescence imaging in living transgenic mice. *Physiol Genomics* 24:173-180.
- Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, Fonatsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y, et al. 1991. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7001-7005.
- Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. 2005. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353:999-1007.
- Wojta J, Kaun C, Breuss JM, Koshelnick Y, Beckmann R, Hattey E, Mildner M, Weninger W, Nakamura T, Tschachler E, Binder BR. 1999. Hepatocyte growth factor increases expression of vascular endothelial growth factor and plasminogen activator inhibitor-1 in human keratinocytes and the vascular endothelial growth factor receptor flk-1 in human endothelial cells. *Lab Invest* 79:427-438.
- Woolfenden S, Zhu H, Charest A. 2009. A Cre/LoxP conditional luciferase reporter transgenic mouse for bioluminescence monitoring of tumorigenesis. *Genesis* 47:659-666.
- Xu H, Dilulio NA, Fairchild RL. 1996. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (IL) 4/IL-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *J Exp Med* 183:1001-1012.
- Yamaguchi Y, Yoshikawa K. 2001. Cutaneous wound healing: an update. *J Dermatol* 28:521-534.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K. 2000. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408:92-96.



- Yang M, Reynoso J, Bouvet M, Hoffman RM. 2009. A transgenic red fluorescent protein-expressing nude mouse for color-coded imaging of the tumor microenvironment. *J Cell Biochem* 106:279-284.
- Yang M, Reynoso J, Jiang P, Li L, Moossa AR, Hoffman RM. 2004. Transgenic nude mouse with ubiquitous green fluorescent protein expression as a host for human tumors. *Cancer Res* 64:8651-8656.
- Yang Z, Xia WH, Zhang YY, Xu SY, Liu X, Zhang XY, Yu BB, Qiu YX, Tao J. 2012. Shear stress-induced activation of Tie2-dependent signaling pathway enhances reendothelialization capacity of early endothelial progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 52:1155-1163.
- Yano M, Iwama A, Nishio H, Suda J, Takada G, Suda T. 1997. Expression and function of murine receptor tyrosine kinases, TIE and TEK, in hematopoietic stem cells. *Blood* 89:4317-4326.
- Yoshida S, Yamaguchi Y, Itami S, Yoshikawa K, Tabata Y, Matsumoto K, Nakamura T. 2003. Neutralization of hepatocyte growth factor leads to retarded cutaneous wound healing associated with decreased neovascularization and granulation tissue formation. *J Invest Dermatol* 120:335-343.
- You LM, Luo J, Wang AP, Zhang GP, Weng HB, Guo YN, Liu YC, Li QM, Teng M. 2009. A hybrid promoter-containing vector for direct cloning and enhanced expression of PCR-amplified ORFs in mammalian cells. *Mol Biol Rep* 37:2757-2765.
- You WK, McDonald DM. 2008. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep* 41:833-839.
- You WK, Sennino B, Williamson CW, Falcon B, Hashizume H, Yao LC, Aftab DT, McDonald DM. 2011. VEGF and c-Met blockade amplify angiogenesis inhibition in pancreatic islet cancer. *Cancer Res* 71:4758-4768.
- Zarnegar R, Michalopoulos GK. 1995. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* 129:1177-1180.
- Zhang N, Fang Z, Contag PR, Purchio AF, West DB. 2004. Tracking angiogenesis induced by skin wounding and contact hypersensitivity using a Vegfr2-luciferase transgenic mouse. *Blood* 103:617-626.
- Zhang Q, Triplett AA, Harms DW, Lin WC, Creamer BA, Rizzino A, Wagner KU. 2010. Temporally and spatially controlled expression of transgenes in embryonic and adult tissues. *Transgenic Res* 19:499-509.
- Zhang YW, Su Y, Volpert OV, Vande Woude GF. 2003. Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12718-12723.
- Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q. 2006. Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 12:4241-4245.
- Zinyk DL, Mercer EH, Harris E, Anderson DJ, Joyner AL. 1998. Fate mapping of the mouse midbrain-hindbrain constriction using a site-specific recombination system. *Curr Biol* 8:665-668.
- Zou HY, Li Q, Lee JH, Arango ME, McDonnell SR, Yamazaki S, Koudriakova TB, Alton G, Cui JJ, Kung PP, Nambu MD, Los G, Bender SL, Mroczkowski B, Christensen JG. 2007. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res* 67:4408-4417.

---

# ANEXOS

---



## TECHNOLOGY REPORT

# A Cre-Reporter Transgenic Mouse Expressing the Far-Red Fluorescent Protein Katushka

Rodrigo Diéguez-Hurtado, Javier Martín, Inés Martínez-Corral, María Dolores Martínez, Diego Megías, David Olmeda, and Sagrario Ortega\*

Biotechnology Program, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain

Received 2 August 2010; Revised 13 October 2010; Accepted 17 October 2010

**Summary:** Cre/*loxP*-dependent expression of fluorescent proteins represents a powerful biological tool for cell lineage, fate-mapping, and genetic analysis. Live tissue imaging has significantly improved with the development of far-red fluorescent proteins, with optimized spectral characteristics for in vivo applications. Here, we report the generation of the first transgenic mouse line expressing the far-red fluorescent protein Katushka, driven by the hybrid CAG promoter upon Cre-mediated recombination. After germ line or tissue-specific Cre-driven reporter activation, Katushka expression is strong and ubiquitous, without toxic effects, allowing fluorescence detection in fresh and fixed samples from all tissues examined. Moreover, fluorescence can be detected by in vivo noninvasive whole-body imaging when Katushka is expressed exclusively in a specific cell population deep within the animal body such as pancreatic beta cells. Thus, this reporter model enables early, widespread, and sensitive in vivo detection of Cre activity and should provide a versatile tool for a wide spectrum of fluorescence and live-imaging applications. *genesis* 49:36–45, 2011.

© 2010 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** Cre recombinase; *loxP*; whole-body; noninvasive; imaging; fluorescence

## INTRODUCTION

The Cre-*loxP* recombination system in combination with the technology for targeted modification of the mouse genome has opened the door for a new era of genetic analysis in mammals (Nagy, 2000). In parallel, the development of fluorescent proteins as reporters in living cells has revolutionized in vivo imaging technologies allowing new insights into the processes that govern mammalian development and disease (Nowotschin *et al.*, 2009). Thus, expression of fluorescent proteins

has been thoroughly used for promoter activity characterization (Yoshimizu *et al.*, 1999), cell-fate analysis (Lombardi *et al.*, 2009) and lineage-tracing (Shenje *et al.*, 2008). Furthermore, fluorescent proteins have been widely used as reporters of Cre-activity in genetic contexts in which their expression is dependent on Cre-mediated recombination of *loxP*-flanked (floxed) sequences (De Gasperi *et al.*, 2008; Elghazi *et al.*, 2008; Luche *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2001; Muzumdar *et al.*, 2007; Srinivas *et al.*, 2001; Stoller *et al.*, 2008; Vinters-ten *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2009). However, the use of most fluorescent proteins for whole-body noninvasive imaging in mammals is constrained due to strong light absorption by hemoglobin at wavelengths below 600 nm, where the excitation and emission spectra of most fluorescent proteins reach a maximum (350–550 nm). Between 600 and 1200 nm, where infrared absorption by water molecules begins, an “optical window” is defined in which tissues are relatively transparent to light (Lin *et al.*, 2009). Red and far-red fluorescent proteins with excitation and emission peaks close to and above 600 nm, respectively, are therefore preferred for in vivo imaging applications.

Recently, a new generation of fluorescent protein markers has emerged with the description of infrared-fluorescent proteins (IFPs) with excitation and emission peaks at 684 and 708 nm, respectively (Shu *et al.*, 2009). These bacteriophytochrome-based fluorescent

\* Correspondence to: Sagrario Ortega, Transgenic Mice Unit, Biotechnology Program, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain. E-mail: sortega@cnio.es

Contract grant sponsor: Ministry of Science and Innovation of Spain, Contract grant numbers: BIO2009-09488 and BIO2006-03213, Contract grant sponsors: CNIO, Madrid's Regional Government

Published online 26 October 2010 in

Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/dvg.20685

proteins require incorporation of biliverdin as the chromophore. Although biliverdin is ubiquitous, its endogenous availability may be highly variable, because the enzyme responsible for its production (heme oxygenase-1) is stress-inducible (Ollinger *et al.*, 2007). Moreover, exogenous administration of biliverdin, necessary to increase the infrared fluorescent signal in intact mice, has diverse anti-inflammatory effects (Overhaus *et al.*, 2006). These issues may limit some *in vivo* applications of IFPs specially when used as promoter activity- or gene-expression- reporters.

The development of Katushka (Shcherbo *et al.*, 2007), an autofluorescent protein characterized by a unique combination of high brightness, far-red emission, and fast rate of chromophore maturation, represents an important contribution to the list of fluorescent markers suitable for whole-body *in vivo* optical imaging. Excitation and emission spectra of Katushka peak at 588 and 635 nm, respectively. Moreover, Katushka is characterized by fast maturation at 37°C and is one of the brightest autofluorescent proteins with an emission maximum beyond 620 nm. All these properties make of Katushka one of the best far-red fluorescent proteins available for *in vivo* tissue imaging.

Here, we describe a novel Cre-reporter transgenic mouse line in which Katushka expression is dependent on Cre-mediated recombination. To our knowledge, this is the first transgenic mouse line expressing Katushka, since only transient expression of this fluorescent protein, after DNA electrotransfer into mouse skin and muscle, has been previously reported (Gothelf *et al.*, 2010; Hojman *et al.*, in press).

The transgenic construct (Fig. 1a,b) in this line (Fig. 1a,b) includes the ubiquitous promoter CAG, composed of the cytomegalovirus (CMV) immediate early enhancer and the modified chicken  $\beta$ -actin promoter (Niwa *et al.*, 1991), a *loxP*-flanked transcription STOP cassette (LSL) (Tsien *et al.*, 1996) followed by the cDNA of Katushka fluorescent protein (KFP), and a rabbit  $\beta$ -globin polyadenylation signal. In this construct, CAG-LSL-KFP, Katushka expression is driven by the CAG promoter upon Cre recombinase-mediated excision of the floxed STOP cassette.

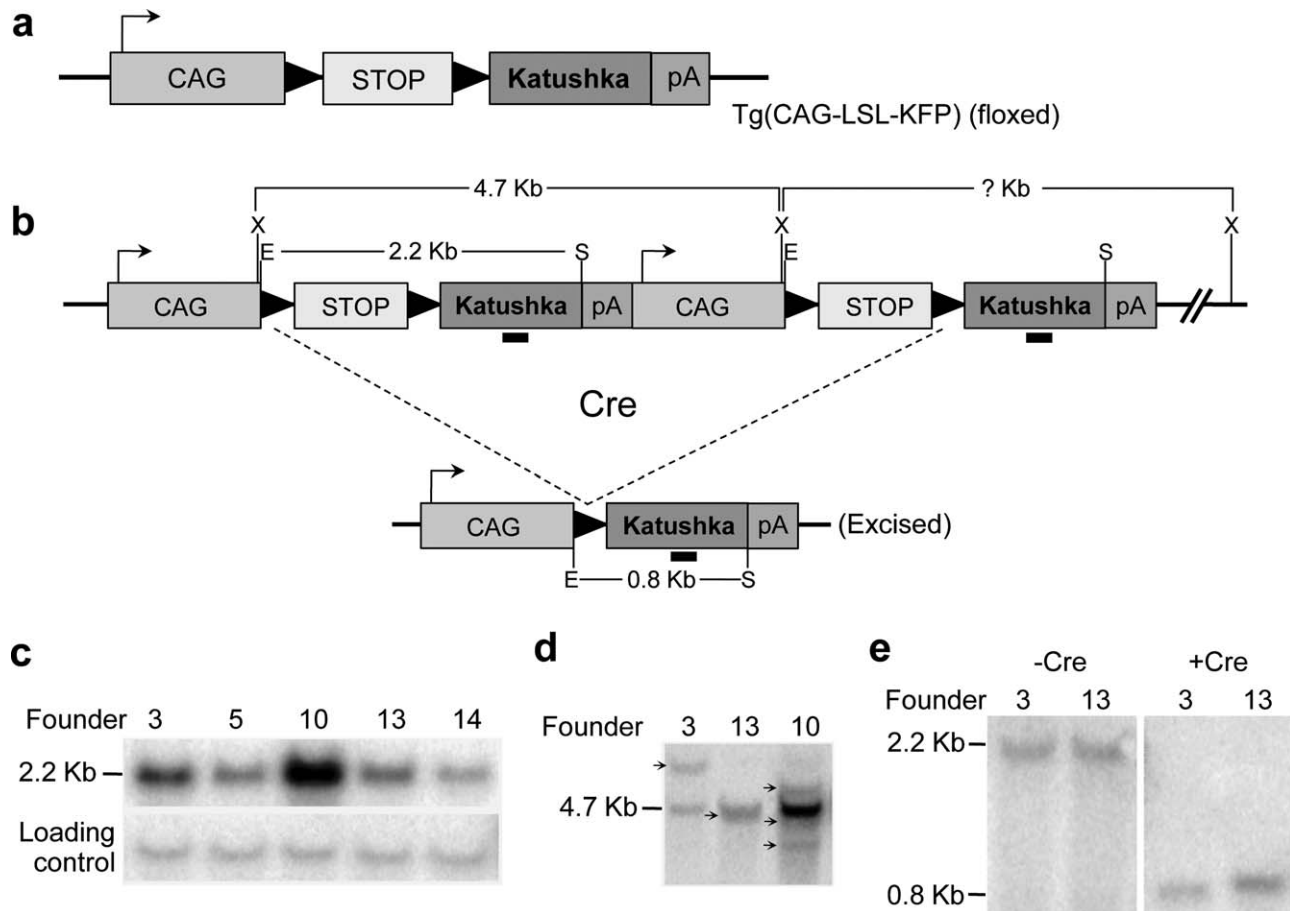
Katushka expression from the transgenic construct was first tested *in vitro* by cotransfection of murine embryonic stem (ES) cells and H460 lung carcinoma cells with the CAG-LSL-KFP-bearing plasmid, alone or in combination with a Cre expressing vector (CMV-NLSCre). In the absence of Cre, none of the CAG-LSL-KFP transfected clones were Katushka-positive, while ES and H460 cells transfected with both the transgenic reporter and CMV-NLSCre exhibited far-red fluorescence (data not shown).

Having validated the construct *in vitro*, transgenic mice were generated by pronuclear injection of the transgene in fertilized oocytes. Five founder mice carry-

ing the Katushka reporter transgene, Tg(CAG-LSL-KFP), were generated, three of which transmitted the transgene to the next generation. Relative transgene copy-number and number of integration events were estimated in these three lines by Southern blot analysis of tail genomic DNA (Fig. 1c,d). Two lines, derived from founders 3 and 13, which contained single integration event, were further expanded and characterized. No significant differences were observed between them. Most of the studies were performed with line 3.

To assess the *in vivo* Cre-dependent control of Katushka expression and its compatibility with normal embryonic development and postnatal life, reporter mice were mated with animals carrying the universal deleter CMV-Cre transgene (Zinyk *et al.*, 1998). The N1 progeny were analyzed for Cre-mediated STOP cassette excision by Southern blot of tail biopsy DNA (Fig. 1b,e) and for Katushka expression by direct fluorescence detection in newborn pups (Fig. 2a). Double transgenic N1[Tg(CMV-Cre);Tg(CAG-LSL-KFP)] pups were born at the expected Mendelian ratio, developed normally and were fertile. They exhibited nearly ubiquitous and intense far-red fluorescence in all the organs examined. N1 animals were further mated with wild-type mice, and the hemizygous offspring carrying the recombined transgenic allele were also born at normal Mendelian ratio (Fig. 2b). These results indicate that there is no toxicity associated with ubiquitous expression of Katushka in mice. Furthermore, multiple generations carrying the germ-line excised and therefore constitutively activated reporter allele have not exhibited any symptoms of Katushka-related toxicity up to 12 months of age, and both males and females are fertile. Katushka fluorescence is robust in all tissues and organs examined from germ-line Cre-activated adult mice, while those of animals with the nonrecombined reporter transgene show a level of tissue autofluorescence indistinguishable from that of control wild-type mice (Fig. 2c,d).

Expression of Katushka was also investigated in hematopoietic lineages of hemizygous mice with a germ-line Cre-recombined reporter allele. Fluorescence-assisted cell sorter analysis of single-cell suspensions from bone marrow and spleen revealed bright far-red fluorescence in the majority of nucleated cells (Fig. 3a). Importantly, no differences regarding fluorescence emission were detected between wild-type controls and animals that had not undergone Cre-mediated recombination. The heterogeneity in fluorescence intensity, especially evident in bone marrow single-cell suspensions, is probably due to the cellular heterogeneity of the analyzed samples. Further analysis of hematopoietic lineages was conducted through antibody-based fractionation of erythrocyte-depleted single-cell suspensions. Cells of hematopoietic origin ( $CD45^+$ ), B lymphocytes ( $CD19^+$ ), T lymphocytes ( $CD4^+$  or  $CD8^+$ ), granulocytes, and monocytes ( $Gr-1^+$ ) from

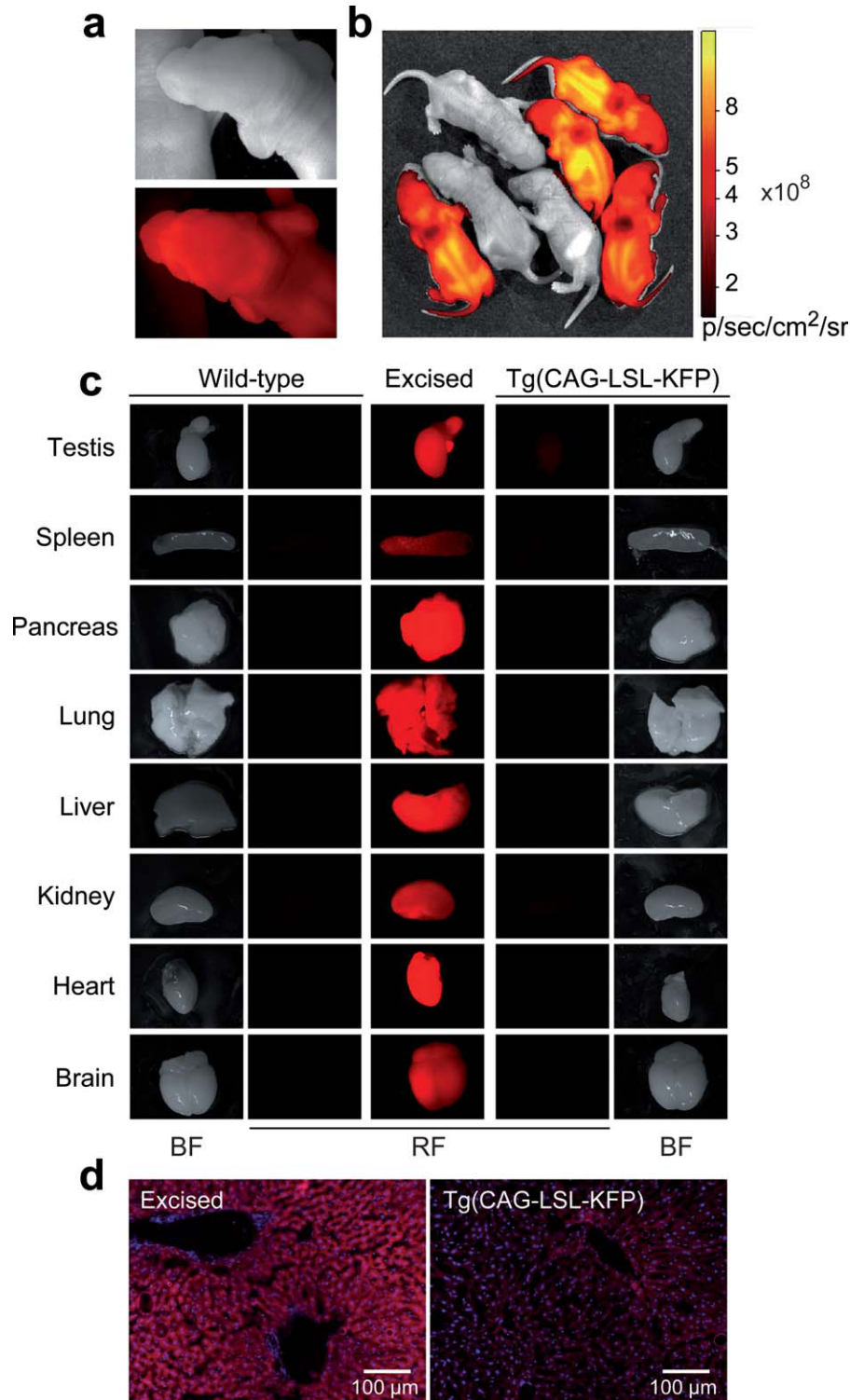


**FIG. 1.** Transgenic construct and founder characterization. **(a)** Schematic structure of the transgenic construct. The transgene contains the CMV early enhancer/chicken  $\beta$ -actin promoter (CAG), a transcription STOP cassette (STOP) flanked by *loxP* sites (black triangles), the Katushka cDNA, and the rabbit  $\beta$ -globin polyadenylation signal (pA). **(b)** Cre-mediated transgene recombination in a head-to-tail multicopy integration event (a two-tandem copy integration is depicted as an example). The position of the relevant restriction sites *EcoRI* (E), *SacI* (S), and *XbaI* (X), the size of the corresponding restriction fragments, and the Katushka cDNA fragment used as a probe for Southern blot (small solid black box) are also indicated. **(c)** Relative transgene copy-number analysis. Southern blot analysis of tail DNA from founders 3, 5, 10, 13, and 14, double-digested with *E* and *S* and hybridized with a probe from Katushka cDNA. The probe recognizes a 2.2 kb internal fragment from the nonrecombined transgenic insert, and the intensity of the signal is proportional to the number of integrated copies. A probe corresponding to the *Tie2* locus was used as loading control. **(d)** Multiple integration site analysis. Southern blot analysis of tail DNA from founders 3, 10, and 13 digested with *X*. Multiple copy integrations in a head-to-tail orientation are identified by a band of 4.7 kb. Multiple integration sites are recognized by the appearance of more than one additional band (additional bands marked with arrowheads). Founders 3 and 13 have a single integration site. **(e)** Cre-dependent transgene recombination analysis. Southern blot analysis of tail DNA from progeny of founders 3 and 13 before and after germ-line Cre-mediated recombination. The 2.2 kb and 0.8 kb bands correspond to the floxed and excised transgenes, respectively.

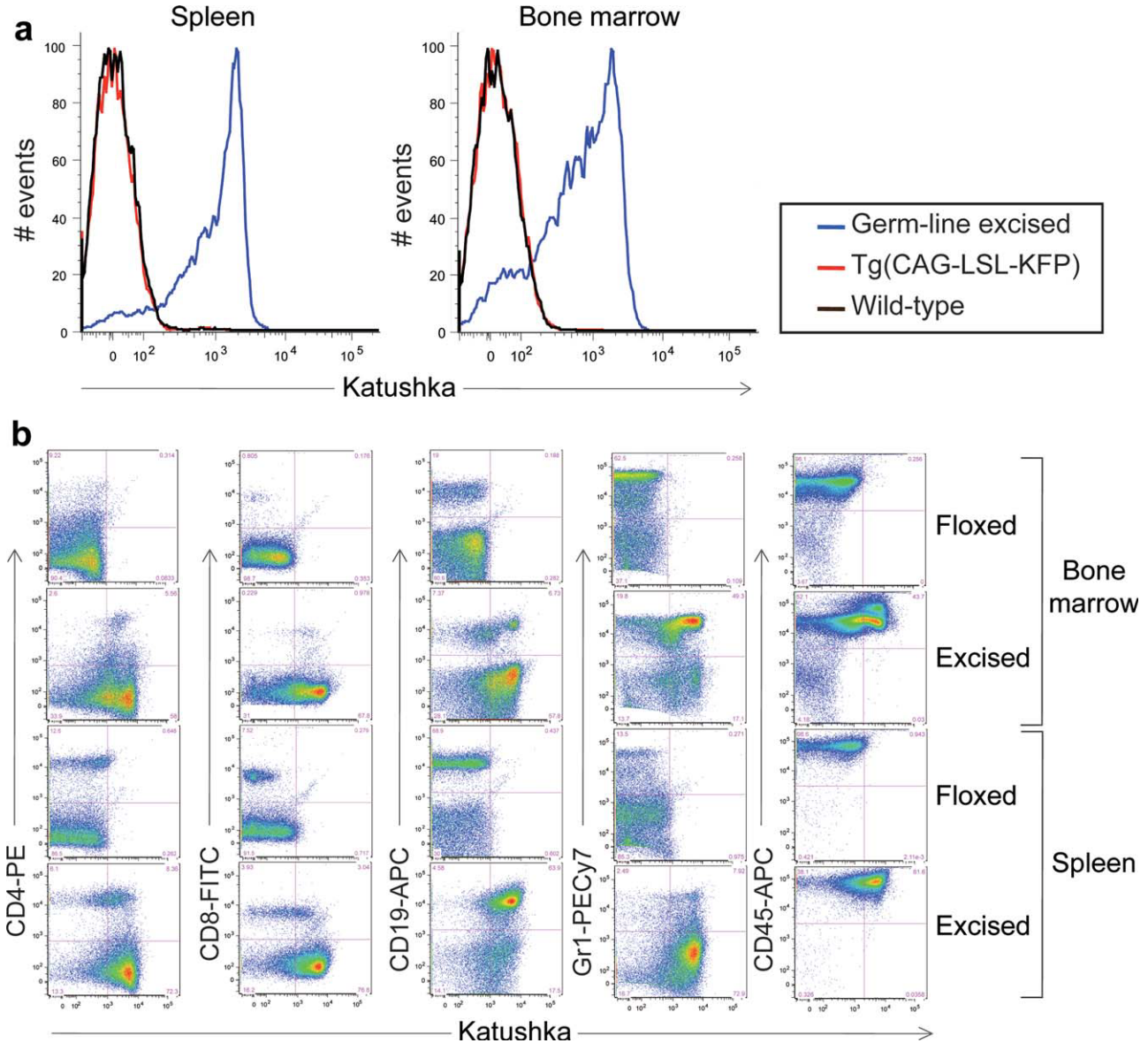
bone marrow and spleen express Katushka to an extent that makes them clearly distinguishable from wild-type or unrecombined control cells (Fig. 3b). Furthermore, constitutive expression of the reporter does not affect the relative abundance of these hematopoietic cell subpopulations with respect to those of wild-type mice (data not shown). Given that germ-line excised mice are not chimeric with regard to the recombination status of the Katushka reporter allele, the level of red fluorescence in different cell populations is mostly determined by the activity of the CAG promoter in each particular cell type.

We next examined whether the Katushka reporter allele was accessible to Cre-mediated excision during early embryogenesis. We crossed our reporter strain with the transgenic line Tg(Sox2-Cre) (Hayashi *et al.*, 2002), in which Cre recombinase expression is driven by the regulatory sequences of the epiblast-specific gene *Sox2*. It has been previously described that *Sox2* mRNA is first detected in some cells of the preimplantation embryo at 2.5 days postcoitum (dpc), at morula stage. In the blastocyst, at 3.5 dpc, *Sox2* is expressed specifically within the inner cell mass (ICM), which later differentiates into two lineages, epiblast and hypo-





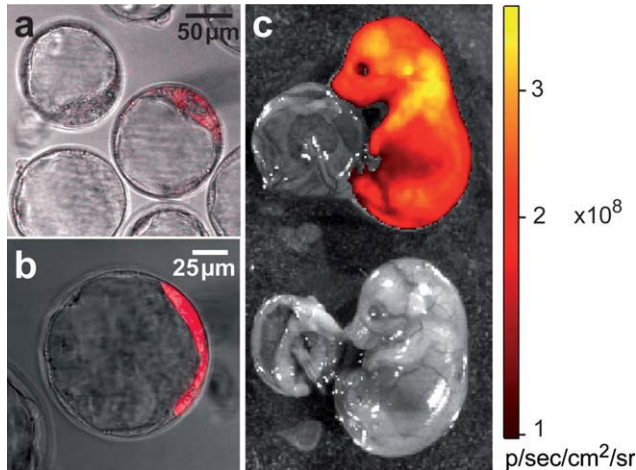
**FIG. 2.** Detection of Katushka fluorescence in reporter mice after Cre-mediated recombination. **(a)** In vivo whole-body direct fluorescence analysis of N1 progeny (newborns) from crosses of Tg(CAG-LSL-KFP) with Tg(CMV-Cre) mice. Top: bright field image of a double transgenic littermate above a single transgenic pup. Bottom: corresponding direct red fluorescence image. Only the double transgenic pup is visible and exhibits ubiquitous and strong expression of Katushka. **(b)** Fluorescence image acquired with an IVIS Spectrum (Xenogen Co.) of seven littermates obtained after mating a germ-line Cre-recombined reporter male with a wild-type female. The four pups with fluorescent signal have inherited the recombined reporter allele while the three without signal have not, as confirmed by PCR genotyping (data not shown). **(c)** Katushka fluorescence in isolated organs of germ-line recombined reporter adult mice (center panel). The two panels at the left show the bright field (BF) and red fluorescence (RF) images of a wild-type mouse as control of tissue autofluorescence, while the two panels at the right show those of a Tg(CAG-LSL-KFP) mouse carrying the intact floxed reporter transgene. **(d)** Direct fluorescence images from liver cryosections of germ-line Cre-excised and original unexcised Tg(CAG-LSL-KFP) reporter mice.



**FIG. 3.** Flow cytometry analysis of Katushka expression in hematopoietic lineages from spleen and bone marrow of mice that inherited one copy of the Cre-recombined reporter allele and lack the Cre transgene. **(a)** Katushka expression in erythrocyte-depleted, unfractionated, hematopoietic cells. Note that Fluorescence-assisted cell sorter-profiles of wild-type (black line) and floxed Tg(CAG-LSL-KFP) mice (red line) are undistinguishable. **(b)** Analysis of Katushka expression in different hematopoietic cell lineages. The dot plots show the fluorescence intensities of different CD4-, CD8-, CD19-, Gr-1-, and CD45-positive cell populations from spleen and bone marrow.

blast (Avilion *et al.*, 2003). In double transgenic Tg(CAG-LSL-KFP);Tg(Sox2-Cre) mice, Katushka expression was first seen at 3.5 dpc in early blastocysts where, as expected, it is restricted to the ICM without residual expression in trophectoderm cells (Fig. 4a). Earlier expression at morula stage was not detected, probably due to incomplete or delayed Cre-recombination. Red fluorescence gains intensity as the blastocyst expands, so that, at 4.5 dpc, the ICM is tightly packed at one pole of the developing embryo and exhibits strong far-red fluorescence (Fig. 4b). Further differentiation of the epi-

blast gives rise to all embryonic tissues, while the majority of extraembryonic components come from the trophectoderm and the hypoblast. Therefore, after implantation and differentiation of embryonic and extraembryonic tissues, Katushka expression is restricted to the developing fetus while the placenta shows no signal over background autofluorescence (Fig. 4c). All these results demonstrate an efficient induction of the reporter by Cre-mediated recombination and robust Katushka expression from a very early stage in mouse embryogenesis.



**FIG. 4.** Epiblast-specific expression of Katushka in double transgenic Tg(CAG-LSL-KFP); Tg(Sox2-Cre) embryos. (a and b) Overlay of single confocal section images of red fluorescence and bright field channels of early blastocysts (3.5 dpc) (a) and late blastocysts (4.5 dpc) (b) obtained from matings of Tg(Sox2-Cre) males and Tg(CAG-LSL-KFP) females. (c) IVIS Spectrum image of developing fetuses (15.5 dpc) from the same type of mating. The embryo at the bottom of the image lacks the Sox2-Cre transgene while the one at the top is double transgenic for Sox2-Cre and the Katushka reporter.

One of the main goals for generating a Cre-reporter transgenic line expressing Katushka was to enable monitoring Cre activity *in vivo* by direct fluorescence detection using noninvasive whole-body optical imaging techniques, even in minor cell populations within the animal body. This has been accomplished before using bioluminescent reporters such as firefly luciferase (Ishikawa and Herschman, 2010; Liao *et al.*, 2007; Lyons *et al.*, 2003; Safran *et al.*, 2003; Woolfenden *et al.*, 2009). The use of fluorescent reporters has the additional advantage of allowing histological analysis through direct imaging using fluorescence- and confocal-microscopy. In order to test if Katushka signal coming from an internal organ can be monitored noninvasively, we crossed our reporter line with the transgenic strain Tg(RIP-Cre) (Gannon *et al.*, 2000) in which the Cre recombinase is expressed specifically in pancreatic  $\beta$ -cells under the control of the rat insulin-2 promoter. Katushka-specific fluorescence is readily detected by noninvasive whole-body optical imaging without ectopic expression (Fig. 5a). Pancreatic origin of the fluorescent signal was confirmed after necropsy and pancreas isolation (Fig. 5b), and further specificity of reporter expression to  $\beta$  cells was verified by confocal microscopy imaging of paraformaldehyde-fixed tissue sections (Fig. 5c,d). These data show that tissue-specific inducibility of the reporter is reliable in adult mice and that the spectral characteristics of Katushka fluorescence enable noninvasive whole-body imaging.

In summary, we have described a Cre-reporter transgenic line that allows early, widespread, and sensitive

detection of Cre-mediated recombination. Unlike previous fluorescence-based Cre-reporter models, this line allows noninvasive whole-body detection of recombination events even in tissues located deep within the animal. Additionally, the possibility to detect Katushka-expressing cells not only cytofluorometrically, but also in paraformaldehyde-fixed tissue sections is another advantage of this reporter line. These characteristics make this line a versatile tool for studies requiring noninvasive, efficient, and sensitive detection of Cre activity.

## METHODS

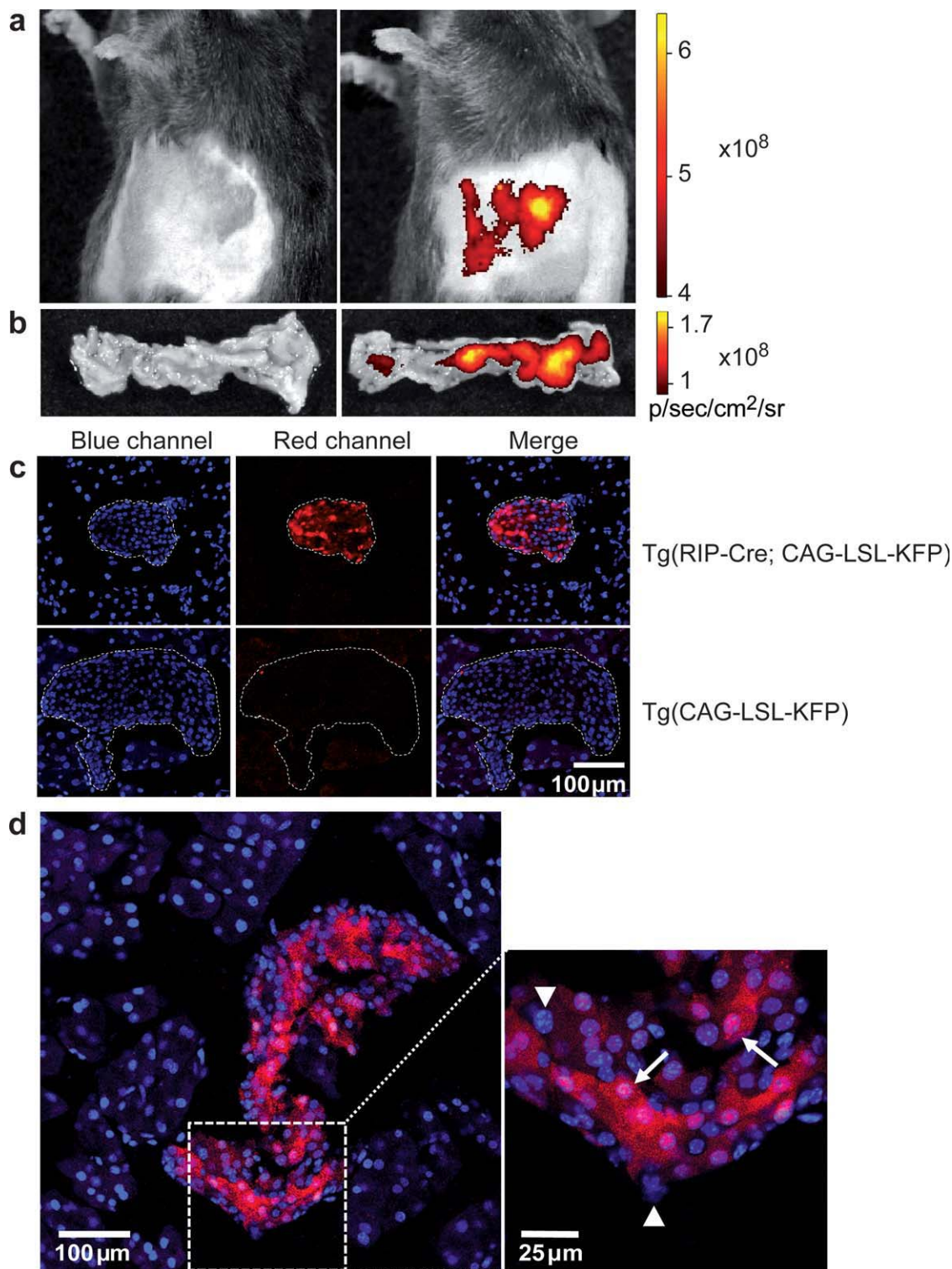
### Transgenic Construct and Generation of Transgenic Mice

The transgene was constructed by inserting a PCR-amplified fragment containing Katushka cDNA from pTurboFP635-C (Evrogen, Moscow, Russia) into the *NotI* site of the pVL1 plasmid (a gift from Angel Nebreda, CNIO). The resulting plasmid contains the CAG promoter followed by a transcription/translation STOP sequence flanked by directly repeated *loxP* sites, the Katushka cDNA, and the rabbit  $\beta$ -globin polyadenylation signal. For transgenic mice generation, a 4.7 kb *PvuII-SalI* fragment containing the reporter transgene was microinjected into the pronuclei of zygotes obtained from crosses of F1 [(C57BL/6J.OlaHsd)(CBA/J)] animals following standard protocols (Nagy, 2003). Potential founders were identified by PCR and Southern blot analyses of tail DNA. PCR primers for transgene genotyping were as follows: Katushka forward primer, 5'-AACGACCACCACTTCAAGTGC-3'; Katushka reverse primer, 5'-TAGCCAGAAGTCAGATGCTCAAGG-3'; Cre forward primer, 5'-CCGGTTATTCAACTTGCACC-3'; Cre reverse primer, 5'-CTGCATTACCGGTCGATGCAAC-3'. All experiments with mice were performed in accordance with protocols revised and approved by the institutional ethics committee of the Spanish National Cancer Research Centre (CNIO).

### Southern Blot Analysis of Transgene Copy Number, Integration Events, and Cre-Mediated Recombination

Tail tips were incubated in lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mg/ml proteinase K, 100 mM NaCl, 0.5% sodium dodecyl sulfate, and 10 mM EDTA at 55°C overnight. After precipitation of proteins and cell debris with saturated NaCl, DNA was precipitated from the supernatant with isopropanol. DNA samples were double digested with *EcoRI* and *SacI* for copy-number and recombination efficiency analysis and with *XbaI* for integration analysis and subjected to electrophoresis on a 0.8% agarose gel. DNA was transferred to a nylon membrane (Amersham Hybond-N+, GE





**FIG. 5.** In vivo assessment of pancreatic- $\beta$ -cell-specific, Cre-mediated expression of Katushka in adult mice. **(a)** IVIS Spectrum whole body fluorescence images of a single transgenic Tg(CAG-LSL-KFP) mouse (left) and a double transgenic Tg(RIP-Cre); Tg(CAG-LSL-KFP) mouse (right). Katushka fluorescence is observed only in the region where the pancreas is positioned. The abdominal region has been previously depilated to avoid signal attenuation by the hair. **(b)** IVIS fluorescence image of the isolated pancreas from mice shown in panel a. **(c)** Confocal images of cryosections of the pancreas shown in panel b after 4% paraformaldehyde fixation and OCT embedding. A white-dashed line has been drawn around the pancreatic islets. Blue channel shows nuclei stained with DAPI. Katushka fluorescence (red channel) is detected only in the double transgenic islet. Background autofluorescence is indistinguishable between single and double transgenic mice. **(d)** Confocal image of a cryosection of the pancreas from the double transgenic mouse shown in panel c (top). Katushka expression is restricted to the  $\beta$ -cells of the pancreatic islets. The zoomed image at the right shows  $\beta$ -cells that strongly express red fluorescence (arrows), while other cells within the pancreatic islet do not express Katushka (arrowheads).

Healthcare, Buckinghamshire, UK). The membrane was hybridized with a 331-bp Katushka probe amplified by PCR using the following primers: forward, 5'-AACGAC-CACCACTTCAAGTGC-3'; reverse, 5'-GGTGAAGTTC-CATCCAACG-3'. The probe was labeled by random priming with Amersham Ready-To-Go DNA labeling beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and dCTP 5'-triphosphate [ $\alpha$ - $^{32}$ P] (Perkin Elmer, Boston, MA). After hybridization and washing, the blot was exposed on a phosphorimager screen and revealed with a Typhoon 9400 scanner (Amersham Biosciences, New Jersey).

### Whole-Body and Isolated Organ Fluorescence Detection

Fluorescence from newborn pups and adult organs was analyzed in a Leica MZ16F (Leica, Wetzlar, Germany) fluorescence stereomicroscope equipped with a Texas Red filter set. For epifluorescence pictures, exposure time was optimized based on the level of fluorescence emitted from each organ: testis 300 ms, spleen 660 ms, pancreas 70 ms, lung 660 ms, liver 300 ms, kidney 660 ms, heart 600 ms, and brain 600 ms. Pictures were captured with a DFC 350 FX (Leica, Wetzlar, Germany) camera. Noninvasive whole-body imaging of fluorescence was performed with the IVIS Spectrum system (Xenogen Co., Alameda, CA). Fluorescence signal was acquired with a band-pass excitation filter of 570 nm (30 nm bandwidth) and a band-pass emission filter of 640 nm (20 nm bandwidth), with a photon acquisition time of 1 s, medium binning and F/Stop 1 or 2. Adult animals were sedated by continuous inhalation of 3% isoflurane during image acquisition. The area of focus was depilated using commercial depilatory creams. For organ fluorescence signal analysis, the various organs were harvested and briefly stored at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS) with 5% fetal bovine serum before imaging acquisition.

### Cytofluorometry

Single-cell suspensions were obtained from bone marrow and spleen using standard procedures. Briefly, mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation and spleen and hind leg long bones dissected. Bone marrow was flushed out with Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma, St. Louis, MO), and splenocytes were obtained by mechanical dissociation of the organ between two glass slides in DMEM. Erythrocytes were lysed with ammonium chloride and cells resuspended in PBS containing 0.5% bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO) and 2 mM EDTA (Sigma, St. Louis, MO). Fc receptors were blocked by incubation with a purified anti-mouse CD16/CD32 antibody (BD Pharmingen, San Jose, CA) for 15 min on ice. Single-cell suspensions were stained with the following monoclonal antibodies from BD Pharmingen, San Jose, CA: phycoerythrin (PE) anti-CD4, fluorescein isothiocyanate anti-CD8, allophycocyanin

(APC) anti-CD19, PE-cyanine 7 (PE-Cy7) anti-Gr-1, and APC anti-CD45. All stainings were performed on 10<sup>6</sup> cells in 200  $\mu$ L for 30 min on ice in the dark. Samples were filtered through a 70- $\mu$ m filter mesh and processed on a BD ARIA II SORP Cell Sorter (BD Pharmingen, San Jose, CA) equipped with 355, 488, 561, and 640 nm lines. Pulse processing was used to exclude cell aggregates and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to discriminate dead cells. At least 50,000 single alive events were collected. Data were analyzed using FlowJo version 9.0.2 (Treestar, Ashland, OR).

### Confocal Microscopy

For analysis of reporter performance in preimplantation embryos, matings were set up between Tg(CAG-LSL-KFP) hemizygous females and Tg(Sox2-Cre) hemizygous males. Mating time was determined by observation of the female vaginal plug (0.5 dpc). Embryos were harvested from pregnant females at 2.5 or 3.5 dpc by flushing oviducts and/or uterine horns with M2 medium (Sigma, St. Louis, MO) and observed immediately after harvesting or incubated in KSOM medium (Specialty Media, Phillipsburg, NJ) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h under oil. Pancreas were dissected and fixed by immersion in 25 ml of 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4 for 2 h at room temperature, and rinsed in three changes of PBS over 30 min and a final rinsing step on a rotary wheel overnight at room temperature. Fixed tissues were embedded in Tissue-Tek OCT (Sakura, Zoeterwoude, NL) on dry ice and stored frozen at -20°C. Ten micrometer-wide sections were collected on Superfrost glass slides (Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) and mounted in Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Images were acquired with a Leica TCS-SP5 (AOBS) Confocal Microscope with 63 $\times$  HCX PL APO 1.30 N.A glycerol immersion objective and 20 $\times$  HCX PL APO CS 0.7 N.A glycerol immersion objective. The software for capture was LAS AF v2.1.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Francisca Mulero and the Molecular Imaging Unit at the CNIO for providing the pTurboFP635-C plasmid and for the support with the use of the IVIS Spectrum, Vanesa Lafarga and Angel Nebreda for the pVL-1 plasmid and Jaime Muñoz and Miriam García for their excellent assistance with mouse colony management.

### LITERATURE CITED

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17:126-140.

- De Gasperi R, Rocher AB, Sosa MA, Wearne SL, Perez GM, Friedrich VL Jr, Hof PR, Elder GA. 2008. The IRG mouse: A two-color fluorescent reporter for assessing Cre-mediated recombination and imaging complex cellular relationships in situ. *Genesis* 46:308–317.
- Elghazi L, Weiss AJ, Gould AP, Hegedus B, Gutmann DH, Bernal-Mizrachi E. 2008. Generation of a reporter mouse line expressing Akt and EGFP upon Cre-mediated recombination. *Genesis* 46:256–264.
- Gannon M, Shiota C, Postic C, Wright CV, Magnuson M. 2000. Analysis of the Cre-mediated recombination driven by rat insulin promoter in embryonic and adult mouse pancreas. *Genesis* 26:139–142.
- Gothelf A, Eriksen J, Hojman P, Gehl J. 2010. Duration and level of transgene expression after gene electrotransfer to skin in mice. *Gene Ther* 17:839–845.
- Hayashi S, Lewis P, Pevny L, McMahon AP. 2002. Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain. *Gene Expr Patterns* 2:93–97.
- Hojman P, Eriksen J, Gehl J. 2009. In vivo imaging of far-red fluorescent proteins after DNA electrotransfer to muscle tissue. *Biol Proced Online* 11:253–262.
- Ishikawa TO, Herschman HR. 2010. Conditional bicistronic cre reporter line expressing both firefly luciferase and  $\beta$ -galactosidase. *Mol Imaging Biol*, Epub ahead of print.
- Liao CP, Zhong C, Saribekyan G, Bading J, Park R, Conti PS, Moats R, Berns A, Shi W, Zhou Z, Nikitin AY, Roy-Burman P. 2007. Mouse models of prostate adenocarcinoma with the capacity to monitor spontaneous carcinogenesis by bioluminescence or fluorescence. *Cancer Res* 67:7525–7533.
- Lin MZ, McKeown MR, Ng HL, Aguilera TA, Shaner NC, Campbell RE, Adams SR, Gross LA, Ma W, Alber T, Tsien RY. 2009. Autofluorescent proteins with excitation in the optical window for intravital imaging in mammals. *Chem Biol* 16:1169–1179.
- Lombardi R, Dong J, Rodriguez G, Bell A, Leung TK, Schwartz RJ, Willerson JT, Brugada R, Marian AJ. 2009. Genetic fate mapping identifies second heart field progenitor cells as a source of adipocytes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Res* 104:1076–1084.
- Luche H, Weber O, Nageswara Rao T, Blum C, Fehling HJ. 2007. Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in “knock-in” Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *Eur J Immunol* 37:43–53.
- Lyons SK, Meuwissen R, Krimpenfort P, Berns A. 2003. The generation of a conditional reporter that enables bioluminescence imaging of Cre/loxP-dependent tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 63:7042–7046.
- Mao X, Fujiwara Y, Chapdelaine A, Yang H, Orkin SH. 2001. Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood* 97:324–326.
- Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. 2007. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45:593–605.
- Nagy A. 2000. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99–109.
- Nagy A. 2003. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 764 p.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193–199.
- Nowotschin S, Eakin GS, Hadjantonakis AK. 2009. Live-imaging fluorescent proteins in mouse embryos: Multi-dimensional, multi-spectral perspectives. *Trends Biotechnol* 27:266–276.
- Ollinger R, Wang H, Yamashita K, Wegiel B, Thomas M, Margreiter R, Bach FH. 2007. Therapeutic applications of bilirubin and biliverdin in transplantation. *Antioxid Redox Signal* 9:2175–2185.
- Overhaus M, Moore BA, Barbato JE, Behrendt FF, Doering JG, Bauer AJ. 2006. Biliverdin protects against polymicrobial sepsis by modulating inflammatory mediators. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G695–G703.
- Safran M, Kim WY, Kung AL, Horner JW, DePinho RA, Kaelin WG Jr. 2003. Mouse reporter strain for noninvasive bioluminescent imaging of cells that have undergone Cre-mediated recombination. *Mol Imaging* 2:297–302.
- Shcherbo D, Merzlyak EM, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Ermakova GV, Solovieva EA, Lukyanov KA, Bogdanova EA, Zaisky AG, Lukyanov S, Chudakov DM. 2007. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods* 4:741–746.
- Shenje LT, Field LJ, Pritchard CA, Guerin CJ, Rubart M, Soonpaa MH, Ang KL, Galinanes M. 2008. Lineage tracing of cardiac explant derived cells. *PLoS One* 3:e1929.
- Shu X, Royant A, Lin MZ, Aguilera TA, Lev-Ram V, Steinbach PA, Tsien RY. 2009. Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science* 324: 804–807.
- Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, William CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. 2001. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1:4.
- Stoller JZ, Degenhardt KR, Huang L, Zhou DD, Lu MM, Epstein JA. 2008. Cre reporter mouse expressing a nuclear localized fusion of GFP and  $\beta$ -galactosidase reveals new derivatives of Pax3-expressing precursors. *Genesis* 46:200–204.
- Tsien JZ, Chen DE, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ, Mayford M, Kandel ER, Tonegawa S. 1996.



- Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87:1317–1326.
- Vintersten K, Monetti C, Gertsenstein M, Zhang P, Laszlo L, Biechele S, Nagy A. 2004. Mouse in red: Red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals. *Genesis* 40:241–246.
- Woolfenden S, Zhu H, Charest A. 2009. A Cre/LoxP conditional luciferase reporter transgenic mouse for bioluminescence monitoring of tumorigenesis. *Genesis* 47:659–666.
- Yamamoto M, Shook NA, Kanisicak O, Yamamoto S, Wosczyzna MN, Camp JR, Goldhamer DJ. 2009. A multifunctional reporter mouse line for Cre- and FLP-dependent lineage analysis. *Genesis* 47:107–114.
- Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, Yeom YI, Ohbo K, Masuko K, Obinata M, Abe K, Scholer HR, Matsui Y. 1999. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev Growth Differ* 41:675–684.
- Zinyk DL, Mercer EH, Harris E, Anderson DJ, Joyner AL. 1998. Fate mapping of the mouse midbrain-hindbrain constriction using a site-specific recombination system. *Curr Biol* 8:665–668.

# In vivo imaging of lymphatic vessels in development, wound healing, inflammation, and tumor metastasis

Inés Martínez-Corral<sup>a,1</sup>, David Olmeda<sup>a,2</sup>, Rodrigo Diéguez-Hurtado<sup>a</sup>, Tuomas Tammela<sup>b</sup>, Kari Alitalo<sup>b</sup>, and Sagarrio Ortega<sup>a,3</sup>

<sup>a</sup>Biotechnology Programme, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), 28029 Madrid, Spain; and <sup>b</sup>Molecular/Cancer Biology Laboratory, Research Programs Unit, Faculty of Medicine, Biomedicum Helsinki, University of Helsinki, 00014, Helsinki, Finland

Edited\* by Joseph Schlessinger, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, and approved March 6, 2012 (received for review September 24, 2011)

**Lymphatic vessel growth or lymphangiogenesis occurs during embryonic development and wound healing and plays an important role in tumor metastasis and inflammatory diseases. However, the possibility of noninvasive detection and quantification of lymphangiogenesis has been lacking. Here, we present the *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> mouse model, where an EGFP-luciferase fusion protein, expressed under the endogenous transcriptional control of the *Vegfr3* gene, allows the monitoring of physiological and pathological lymphangiogenesis in vivo. We show tracking of lymphatic vessel development during embryogenesis as well as lymphangiogenesis induced by specific growth factors, during wound healing and in contact hypersensitivity (CHS) - induced inflammation where we also monitor down-regulation of lymphangiogenesis by the glucocorticoid dexamethasone. Importantly, the *Vegfr3*-reporter allowed us to track tumor-induced lymphangiogenesis at the tumor periphery and in lymph nodes in association with the metastatic process. This is the first reporter mouse model for luminescence imaging of lymphangiogenesis. It should provide an important tool for studying the involvement of lymphangiogenesis in pathological processes.**

bioluminescence | fluorescence | knockin mouse

In adults, lymphangiogenesis occurs during the formation of the corpus luteum and during wound healing, and may be abundant in association with pathological processes (1). Thus, lymphangiogenesis typically occurs at sites of inflammation induced by factors produced by macrophages and granulocytes. The process contributes to reduction of tissue edema and activation of immune responses by facilitating fluid drainage and the transport of dendritic cells and macrophages (2–4). The lymphatic system is also a main route of tumor dissemination and metastasis. Tumor invasion to regional lymph nodes is often the first sign of tumor metastasis and a marker of poor prognosis. Stimulation of growth and dilation of preexisting lymphatic vessels by the tumor facilitates tumor spread via the lymphatics (5–7) and the contribution of intratumoral lymphangiogenesis may depend on tumor type (8–12). Moreover, lymphangiogenic growth factors produced by the tumor may induce sinusoidal hyperplasia in the regional lymph node and this process may further contribute to tumor metastasis (13–15). However, the events that lead to dissemination of tumor cells through the lymphatic system are still poorly understood. Elucidation of these steps is crucial for the design of new anti-metastatic therapeutic strategies.

Despite the importance of lymphangiogenesis as a therapeutic target, still there are very few models to trace and study this process in vivo. Several transgenic mouse lines for fluorescent visualization of lymphatic vessels have recently been reported. All these lines are based on gene-targeted BAC transgenic constructs to express either GFP (16), mOrange (17), or Tomato (18) fluorescent proteins under *Prox-1* transcriptional control. Positron emission tomography (PET) combined with radiolabeled anti-LYVE-1 antibodies have also been used for in vivo imaging of lymphatics in mice (19). We have generated a reporter mouse line for in vivo imaging of lymphatic vessels in which a dual reporter for fluorescence and luminescence (EGFP<sup>Luc</sup>) is expressed under the endogenous transcriptional

control of the *Vegfr3* (vascular endothelial growth factor receptor 3) gene, the first lymphatic marker discovered (20). Although *Vegfr3* is also expressed, to some extent, in the tip cells of the newly formed blood capillaries (21–23) and in fenestrated endothelium (24), it is still one of the best markers for all lymphatic endothelial cells. Outside the vascular system *Vegfr3* expression has been described in subpopulations of monocytes and macrophages (25) and in embryonic osteoblasts and neural progenitors (26, 27). We have validated this reporter for tracking lymphatic vessels in vivo during development, and lymphangiogenesis after administration of specific growth factors and inhibitors, in wound healing, inflammation and tumor dissemination.

## Results

**Generation of *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> Knockin Mice.** To create the reporter allele, an EGFP<sup>Luc</sup>-encoding sequence, preceded by an IRES (internal ribosome entry site) element, was introduced into the 3'-UTR of the mouse *Vegfr3* locus by gene targeting (Fig. 1A). Details of the targeting strategy are described in Fig. S1. The introduction of the IRES-EGFP<sup>Luc</sup> cassette in the 3'-UTR of the *Vegfr3* gene does not significantly alter the expression of *Vegfr3* (Fig. S2). The level of the EGFP<sup>Luc</sup> protein is proportional to gene dose in +/KI and KI/KI embryos, respectively (Fig. S2B).

**Detection of EGFP in Lymphatic Vessels During Development.** VEGFR3 is first detected in blood vessel endothelial cells at 8.5 d of mouse embryonic development (E8.5), thus preceding the differentiation of the lymphatic vasculature (E9.0–9.5) (28). Upon formation of the lymphatic vascular network from preexisting embryonic blood vessels, *Vegfr3* expression is high in the developing lymphatic endothelium and is down-regulated in blood vessels (29). Detection of *Vegfr3* expression by direct EGFP fluorescence in whole-body *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> embryos allows direct tracking of the early stages of mouse lymphatic vessel development. At E11.5, low EGFP expression is detected in embryonic blood vessels (Fig. 1B, red arrows), whereas a strong fluorescence signal is also detected in cells committed to form the primary lymphatic network (Fig. 1B, white arrows). At E12.5, a lymphatic vascular structure expressing high levels of EGFP/*Vegfr3* is observed. Simultaneously, EGFP fluorescence decreases in the blood vessels. At E13.5, a vascular lymphatic network expressing high levels of EGFP has developed and EGFP expression is no longer detected in the blood vessels (Fig. 1B). In normal skin, EGFP fluorescence is detected in lymphatic vessels

Author contributions: S.O. designed research; I.M.-C., D.O., and R.D.-H. performed research; T.T. and K.A. contributed new reagents/analytic tools; I.M.-C., D.O., R.D.-H., T.T., K.A., and S.O. analyzed data; and I.M.-C., D.O., and S.O. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

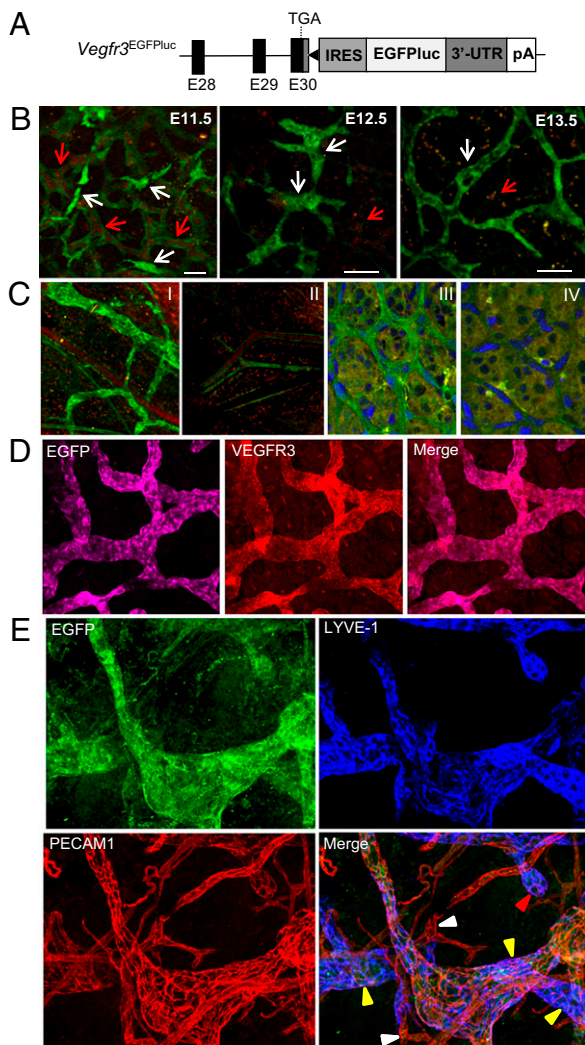
\*This Direct Submission article had a prearranged editor.

<sup>1</sup>Present address: Cancer Research UK London Research Institute, London WC2A 3PX, United Kingdom.

<sup>2</sup>Present address: Molecular Pathology Programme, Spanish National Cancer Research Centre, 28029 Madrid, Spain.

<sup>3</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: sortega@cnio.es.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1115542109/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1115542109/-DCSupplemental).



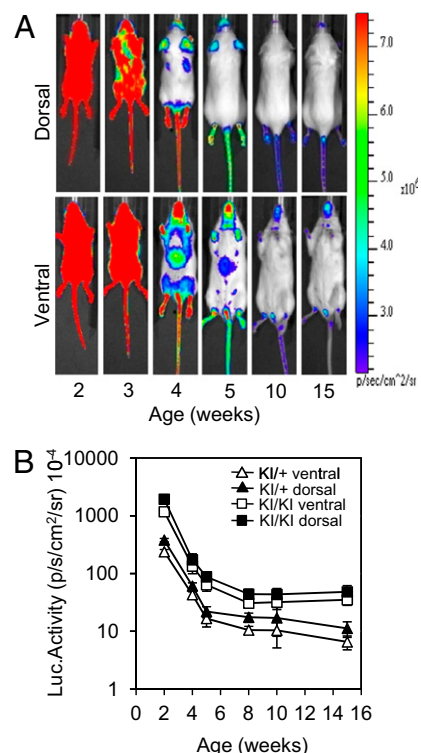
**Fig. 1.** *Vegfr3* expression during development. (A) Schematic structure of the 3' region of the *Vegfr3*<sup>EGFP/Luc</sup> KI allele. The last three coding exons of the *Vegfr3* gene (E28 to E30) are represented by black boxes. The 3'-UTR (dark gray box), the position of the Stop codon (TGA), and the *Vegfr3* polyadenylation signal (pA) are also shown. The black triangle represents an *frt* site remaining after Flp-mediated excision of the neomycin resistance cassette used for gene targeting. (B) Whole-body confocal images (EGFP) of *Vegfr3*-expressing cells during lymphatic vessel development in E11.5–E13.5 *Vegfr3*<sup>EGFP/Luc</sup> (KI/KI) embryos. Notice the EGFP expression in blood vessels (identified by the autofluorescence of the erythrocytes (red arrows)) at E11.5 while at E13.5 EGFP expression becomes restricted to the lymphatic vessels. Scale bar = 50  $\mu$ m. (C) Confocal overlay of red and green channels of the ear skin (I and II) and retina (III and IV) from 3-wk- and 7-d-old animals respectively. *Vegfr3*<sup>EGFP/Luc</sup> (KI/KI) mice (I and III). WT mice (II and IV). Nuclei are stained with DAPI (II and IV). (D) Confocal images of EGFP and VEGFR3 whole-mount immunofluorescence staining of the ear skin from 2-wk-old mice. (E) Expression of EGFP, LYVE-1 and PECAM1 in lymphatic vessels in the skin. Initial lymphatic capillaries (yellow arrowheads) some with blunt endings (red arrowhead), are EGFP+ and LYVE-1+. In PECAM1+ blood vessels (white arrowheads) only autofluorescence of red blood cells is detected.

but not in blood vessels (Fig. 1C, I and II). EGFP fluorescence can be monitored simultaneously with EGFP immunofluorescence detection (Fig. S3A). Costaining with different lymphatic markers shows coexpression of EGFP and *Vegfr3* in all endothelial cells of the dermal lymphatic network (Fig. 1D). In the skin of 3-wk-old mice EGFP and VEGFR3 colocalize with the lymphatic marker LYVE-1 in lymphatic capillaries (Fig. 1E and Fig. S3B, respectively). EGFP is not expressed in platelet

endothelial cell adhesion molecule (PECAM)1<sup>+</sup> blood vessels where only autofluorescence of red blood cells is detected (Fig. 1E, white arrowheads). EGFP fluorescence is also detected in growing blood capillaries of the postnatal retina (Fig. 1C, III and IV) where VEGFR3 regulates angiogenic sprouting (21).

**Whole Body Imaging of Postnatal *Vegfr3* Expression.** *Vegfr3* is expressed at low levels in adult lymphatic vessels and is up-regulated during lymphangiogenesis (30). Moreover, mouse lymphatic vessels become independent of VEGFR3 signaling for maturation after the first 2 wk of postnatal life, although they still respond to VEGF-C/VEGFR3 signaling (30, 31). Whole-body luciferase activity was monitored in *Vegfr3*<sup>EGFP/Luc</sup> mice from the early postnatal period to adulthood. Luciferase signal strongly decreases between weeks 2–5 of postnatal life (Fig. 2A and B), coinciding with the time during which lymphatic vessels become independent of VEGFR3 signaling and reaches a basal level at around 10 wk of age. A similar decrease is observed when luciferase signal is quantified using a region of interest (ROI) defined in the hind right paw, devoid of hair (Fig. S4A). Quantification of luciferase activity from tissue extracts shows a parallel down-regulation from postnatal weeks 4–14 (Fig. S4B). Western blot analysis confirmed that EGFP/Luc protein levels decrease in parallel to those of VEGFR3 in different organs, including skin (Fig. S4C). As expected, whole-body luciferase signal in homozygous versus heterozygous mice is proportional to the reporter gene dose (Fig. 2B and Fig. S4A). Altogether, these results show that *Vegfr3* expression is developmentally regulated during early postnatal life in mice.

**Imaging of Lymphangiogenesis Induced by Specific Growth Factors.** To test the specificity and sensitivity of the *Vegfr3*<sup>EGFP/Luc</sup> reporter for imaging lymphangiogenesis in adult mice, we injected immune compromised athymic nu/nu (CrI:NU(Ico)-Foxn1nu)



**Fig. 2.** Postnatal whole body luciferase detection. (A) Representative dorsal and ventral whole-body images of luciferase expression in *Vegfr3*<sup>EGFP/Luc</sup> (KI/KI) and (+/KI) females during the first 15 wk of age. (B) Quantification of whole-body luciferase signal (mean  $\pm$  SD).





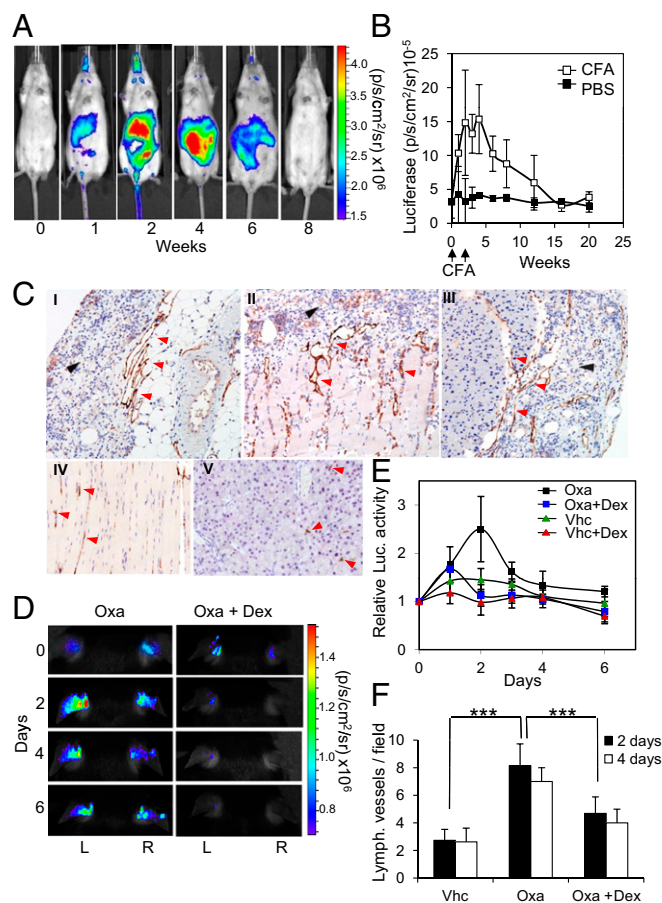
strong inflammatory reaction at the injection site with formation of granulomas and hyperplasia and structural changes of lymph nodes (43). *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> females were treated with i.p. injection of (CFA) (44). A robust and transient increase in luciferase activity was observed in the abdominal area of CFA-treated females (Fig. 5*A* and *B*). Immunohistological analysis of abdominal organs from CFA-treated animals revealed the presence of an inflammatory infiltrate surrounding all abdominal organs (Fig. 5*C*, black arrowheads), concomitant with a high density of dilated VEGFR3<sup>+</sup> lymphatic vessels between the normal and the inflammatory tissue in all organs examined (Fig. 5*C*, red arrowheads). The great majority of inflammatory cells were negative for *Vegfr3* expression (Fig. S7*A*), and, therefore, the induction of luciferase signal reflects the accumulation of *Vegfr3*-expressing lymphatic vessels in all of the abdominal organs in response to CFA-treatment.

Next, we explored *Vegfr3* expression and lymphangiogenesis associated to contact hypersensitivity (CSH), a local inflamma-

tory response induced by exposure to a chemical agent (challenge) to which the individual has been previously sensitized. *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> +/KI females were presensitized 6 d before they were challenged with oxazolone (Oxa). The Oxa challenge induced a two- to threefold increase of luciferase signal over the basal level 2 d after challenge (Fig. 5*D* and *E*), coinciding with the time of maximal inflammation (Fig. S7*B*). A weak increase of luciferase signal was also observed in the control right ears because of cross-contamination with Oxa during grooming. Immunohistological analysis of the Oxa-treated ears, 2 and 4 d after challenge, revealed a marked and transient expansion of the dermis with severe infiltration of immune cells and lymphatic vessel enlargement (Fig. S7*C*). A threefold increase of lymphatic vessel density in Oxa-treated ears, compared with control ears, was observed 2 d after the challenge showing a strong correlation with the increase in luciferase signal detected in vivo (Fig. 5*F*). Dex administration significantly reduced luciferase induction by Oxa challenge (Fig. 5*D* and *E*), as well as inflammation and swelling (Fig. S7*B* and *C*). Histological analysis of Oxa plus Dex-treated ears revealed a decrease in leukocyte infiltration and VEGFR3 immunostaining to levels comparable to those of control ears (Fig. S7*C*). Dex treatment also prevented the increase in lymphatic vessel density (Fig. 5*F*). These results further support the association of inflammation and lymphangiogenesis and validate the *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> model as a reporter of these processes in vivo.

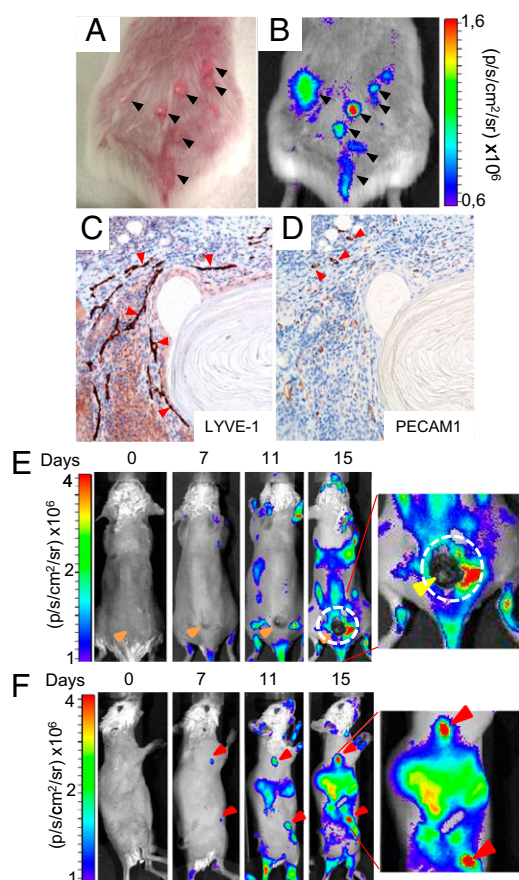
**In Vivo Imaging of Tumor-Induced Lymphangiogenesis.** Next, we wanted to explore the potential of the *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> reporter strain for imaging tumor-induced lymphangiogenesis, both at the periphery of the tumor and at the lymph nodes and its correlation with the tumor metastatic potential. Benign pre-metastatic papillomas, promoted by a conventional two-stage skin carcinogenesis protocol (45), are characterized by an accumulation of enlarged lymphatic vessels at the periphery of the tumor (14). We first explored whether the peripheral lymphangiogenic response in dimethylbenzanthracene/12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (DMBA/TPA)-induced papillomas could be traced by in vivo luminescence detection. *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> females treated with DMBA/TPA developed papillomas that exhibited a local increase in luciferase emission (Fig. 6*A* and *B*). Histological analysis of the papillomas confirmed the accumulation of enlarged LYVE-1<sup>+</sup>, PECAM1<sup>low</sup> lymphatic vessels in the periphery of the tumors (Fig. 6*C* and *D*). No significant increase in luciferase signal from other organs, including lymph nodes, was observed in this assay at this stage of tumor progression.

Melanoma is one of the tumors that metastasize mainly through invasion of the regional lymph nodes (46–49). To explore the capacity of the reporter to track lymphangiogenesis in a highly metastatic tumor context, we used a xenograft assay by s.c. injection of the metastatic mouse melanoma cell line (B16-V5) (50) in *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> +/KI females, backcrossed into the B6(Cg)-Tyr<sup>C2J</sup>/J genetic background for 5 generations. Luciferase signal was induced in mice during B16-V5 tumor xenograft growth (Fig. 6*E*). Because of the high melanin content and dark pigmentation of the B16-V5 cells, any light emission from the tumor is expected to be mostly absorbed by the melanin, making it impossible to properly quantify the intratumor lymphangiogenesis (yellow arrowhead in expanded panel of Fig. 6*E*). Instead, an increase in luciferase signal is detected in the periphery of the tumor (Fig. 6*A*, white circle) that correlates with the accumulation of enlarged LYVE-1<sup>+</sup> lymphatic vessels in the surrounding skin (Fig. S8*A*). The luciferase signal at the periphery of the tumor increased proportionally to the increase in tumor volume (Fig. S8*F*), reaching a maximum of fourfold over the basal luminescence level when the tumor size was ~1 cm<sup>3</sup>. Moreover, an increase in luciferase signal parallel to tumor growth was also observed in distant parts of the body, particularly in lymph nodes (Fig. 6*F*, red arrowheads). Quantification of the luciferase signal from both the proximal (inguinal) and distal (axillar) lymph nodes when the tumor was 1 cm<sup>3</sup> in size also



**Fig. 5.** Imaging of inflammation-induced lymphangiogenesis. (A) In vivo imaging of whole-body luciferase activity from *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> (+/KI) females in response to i.p. injection of CFA. CFA was injected at 0 and 2 wk. (B) Whole-body luciferase activity (mean ± SD) at different weeks after CFA injection or PBS injection as control. (C) VEGFR3 immunohistochemistry of animals treated with CFA for 4 wk. Red arrowheads: enlarged lymphatic vessels. Black arrowheads: inflammatory infiltrate. Lipogranuloma (I); peritoneum treated (II) and untreated (IV); pancreas treated (III) and untreated (V). (D) Luciferase activity from two *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> (KI/KI) females at different times after topical administration of Oxa or Oxa + Dex, respectively, to the left ears (L). The right ear (R) in both Oxa- or Oxa+Dex-treated females received only vehicle. (E) Quantification of luciferase activity (mean fold induction over the luciferase activity at day 0 ± SD) in the different groups of treated ears. (F) Quantification of lymphatic vessel density (number of VEGFR3<sup>+</sup> vessels/field) at the site of inflammation at days 2 and 4 after Oxa challenge. The results show the mean number of lymphatic vessel ± SD. ANOVA: Vhc vs. Oxa, \*\*\**P* = 0.00087; Oxa vs. Oxa + Dex, \*\*\**P* = 0.00094.





**Fig. 6.** Tumor lymphangiogenesis. (A) Skin papillomas (arrowheads) induced by administration of DMBA/TPA on the dorsal skin of *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> +/K1 females. (B) Corresponding whole -body luciferase emission (arrowheads point to each one of the papillomas in A). (C and D) Immunohistochemical detection of lymphatic vessels (LYVE-1<sup>+</sup>) and blood vessels (strong PECAM1<sup>+</sup>) surrounding the papillomas in consecutive sections of the same tumor. Vessels are indicated by arrowheads. (E) Whole-body dorsal images of luciferase in a *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> female injected s.c. with B16-V5 cells, at different times after injection. Arrowheads: position of the injection and of the resulting tumor. Note that the dark pigmentation of the B16-V5 melanoma cells blocks luciferase emission from the tumor (yellow arrowhead in the expanded panel). The white lines surround the signal from the periphery of the tumor. (F) Whole-body lateral images of luciferase activity in a *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> female injected with B16-V5 cells. Lymph node luciferase signal is indicated by red arrowheads.

showed a fourfold increase over the basal level in both cases (Fig. S8G). Histological analysis of the inguinal lymph node shows that the increase in luciferase emission correlates with an increase in lymph node volume, follicular hyperplasia, and expansion of a vascular network of LYVE-1-reactive vessels (Fig. S8 B–E). The presence of metastatic cells in the inguinal lymph node was analyzed by S-100 immunostaining at the time of maximum luciferase signal, revealing the presence of very few isolated metastatic cells proximal to lymphatic vessels (Fig. S9). Therefore, the *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> mouse model is suitable for imaging not only tumor-induced lymphangiogenesis at the periphery of the tumor but also the responses of the sentinel and distant lymph nodes associated with the metastatic process.

## Discussion

We describe a knockin mouse model for in vivo imaging of lymphatics and lymphangiogenesis based on the expression of the dual fluorescence and luminescence reporter (EGFP<sub>Luc</sub>) driven by the transcriptional control of the *Vegfr3* gene. The

reporter was targeted to the 3'-UTR of *Vegfr3*. No phenotype has been detected in *Vegfr3*<sup>EGFPLuc</sup> KI/KI mice. Individual lymphatics can be visualized at the cellular level by direct EGFP fluorescence and by EGFPLuc immunodetection both in embryos and during the first weeks after birth in our model; however, EGFP is harder to detect in adult mice. Quantification of whole-body luciferase signal, as well as luciferase activity in tissue extracts, shows that *Vegfr3* transcriptional activity is strongly down-regulated during postnatal development. We also show that EGFPLuc protein down-regulation parallels that of VEGFR3. A similar level of down-regulation has been described for *Vegfr2* (51) using the same approach, suggesting a common mechanism of postnatal transcriptional down-regulation for these endothelial receptors. This down-regulation may account for the low expression levels of the EGFPLuc reporter in adult mice. By contrast, in previously described transgenic reporter models in which fluorescent protein expression is driven by *Prox1* transcriptional control elements, reporter expression is sustained from embryos to adults (16, 17). This may represent an advantage of these models for fluorescence visualization of individual lymphatics in adults. However, the luciferase in our reporter provides an excellent tool for noninvasive whole-body imaging through all stages of development, including adult tissues. Luciferase signal can be detected from a depth of 2 cm in tissues, and the sensitivity of luminescence is several orders of magnitude higher than that of fluorescence (52), which makes it optimal for noninvasive detection and quantification of lymphangiogenesis even from internal organs.

We have thoroughly tested the *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> model as a reporter of lymphangiogenesis *in vivo* in adult mice. AdVEGF-C-induced lymphangiogenesis results in a strong (eightfold) local increase in luciferase activity in the ear assay, whereas AdVEGF-E, a potent angiogenic growth factor, or AdVEGF-B167 do not increase luciferase signal significantly over that mediated by injection of PBS in the same conditions. We also observed an increase in luciferase signal associated with lymphangiogenesis in wound healing and in acute inflammation assays. Because *Vegfr3* expression has been reported in inflammatory monocytes and macrophages recruited to the injured tissue (25, 36), the global increase in luciferase signal in these assays may, in principle, result from both an increase in lymphatic vessel density and the recruitment of VEGFR3<sup>+</sup> inflammatory cells. However, we have found a tight correlation between the increase in luciferase signal and the increase in lymphatic vessel density during wound healing and in inflammation, with no significant contribution of VEGFR3<sup>+</sup> cells from the inflammatory infiltrate. Thus, the luciferase signal reflects mostly the increase of VEGFR3<sup>+</sup> lymphatic vessel density.

We also show that our model is suitable for imaging tumor-induced lymphangiogenesis. Papillomas generated by the conventional DMBA/TPA skin carcinogenesis exhibit accumulation of lymphatic vessels in the peripheral skin that can be detected by an increase in luciferase signal in our model. Moreover, s.c. injection of the highly metastatic B16-V5 mouse melanoma cell line results in induction of luciferase signal not only at the tumor periphery but also, and very interestingly, at the proximal and distal lymph nodes. The increase of luciferase signal correlates with an expansion of the vascular network, increase in lymph node volume and follicular hyperplasia. Regional lymph node metastasis represents the first step in the dissemination for a variety of human malignant tumors, including melanoma, and invasion of sentinel lymph nodes by tumor cells is associated to bad tumor prognosis (53). Several groups have reported that tumor-induced lymphangiogenesis at sentinel lymph nodes, precedes and contributes to tumor metastasis (14, 54). In our model, the increase in luciferase signal at the proximal lymph node also seems to precede lymph node metastasis since at the time of maximal luciferase induction it is hard to find metastatic cells in the lymph node. Interestingly, we also detected an increase in luciferase signal at distant lymph nodes, in agreement with previous observations that tumor



produced VEGF-C induces lymph node lymphangiogenesis and promotion of metastasis beyond the sentinel lymph nodes (14). Moreover, our model also detects a generalized or “systemic” increase in luciferase signal outside of the lymph nodes in response to tumor growth that may reflect a tumor-induced systemic lymphangiogenic or inflammatory response with increased VEGFR3 expression levels. This response needs further investigation and indicates that tumors may induce a systemic lymphangiogenic response that prepares and facilitates their metastatic spread to distant organs, thus supporting classical Paget’s hypothesis of “seed and soil” for tumor dissemination and metastasis. This is a unique description of noninvasive optical imaging of tumor-induced lymphangiogenesis and lymph node metastasis in mice. Our model may provide a unique tool

for analyzing and predicting metastatic potential and for developing antimetastatic therapies.

## Materials and Methods

The *Vegfr3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> reporter allele was maintained in a mixed CD-1;129Sv; C57BL/6J genetic background selecting albino mice for breeding, or backcrossed to albino B6(Cg)-*Tyr<sup>C-2J</sup>*/J mice for five generations. All experiments with mice were performed in accordance with protocols revised and approved by the Institutional Ethics Committee. A detailed description of the materials and methods is available in [SI Materials and Methods](#).

**ACKNOWLEDGMENTS.** The support of the Spanish National Cancer Research Centre (CNIO) Transgenesis, Comparative Pathology, Confocal Microscopy, Molecular Imaging, and Animal Facility Core Units is greatly acknowledged. This work was supported by the Ministry of Science and Innovation of Spain Grants BIO2009-09488 and BIO2006-03213 (to S.O.) and by the CNIO.

- Karpanen T, Alitalo K (2008) Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol* 3:367–397.
- Baluk P, et al. (2005) Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest* 115:247–257.
- Kataru RP, et al. (2009) Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution. *Blood* 113:5650–5659.
- Kerjaschki D (2005) The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *J Clin Invest* 115:2316–2319.
- Skobe M, et al. (2001) Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 7:192–198.
- Stacker SA, et al. (2001) VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 7:186–191.
- Karpanen T, et al. (2001) Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 61:1786–1790.
- Wong SY, et al. (2005) Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis. *Cancer Res* 65:9789–9798.
- Sipos B, et al. (2005) Lymphatic spread of ductal pancreatic adenocarcinoma is independent of lymphangiogenesis. *J Pathol* 207:301–312.
- Padera TP, et al. (2002) Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 296:1883–1886.
- Sugiura T, et al. (2009) VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. *Int J Oncol* 34:673–680.
- Williams CS, et al. (2003) Absence of lymphangiogenesis and intratumoral lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol* 200:195–206.
- Dadras SS, et al. (2005) Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol* 18:1232–1242.
- Hirakawa S, et al. (2007) VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood* 109:1010–1017.
- Tobler NE, Detmar M (2006) Tumor and lymph node lymphangiogenesis—impact on cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 80:691–696.
- Choi I, et al. (2011) Visualization of lymphatic vessels by Prox1-promoter directed GFP reporter in a bacterial artificial chromosome-based transgenic mouse. *Blood* 117:362–365.
- Hägerling R, Pollmann C, Kremer L, Andresen V, Kiefer F (2011) Intravital two-photon microscopy of lymphatic vessel development and function using a transgenic Prox1 promoter-directed mOrange2 reporter mouse. *Biochem Soc Trans* 39:1674–1681.
- Truman LA, et al. (2012) Prox1 lymphatic vessel reporter mice reveal Prox1 expression in the adrenal medulla, megakaryocytes, and platelets. *Am J Pathol*, 10.1016/j.ajpath.2011.12.026.
- Mumprecht V, et al. (2010) In vivo imaging of inflammation- and tumor-induced lymph node lymphangiogenesis by immuno-positron emission tomography. *Cancer Res* 70:8842–8851.
- Tammela T, Alitalo K (2010) Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 140:460–476.
- Tammela T, et al. (2011) VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling. *Nat Cell Biol* 13:1202–1213.
- Tammela T, et al. (2008) Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 454:656–660.
- Petrova TV, et al. (2008) VEGFR-3 expression is restricted to blood and lymphatic vessels in solid tumors. *Cancer Cell* 13:554–556.
- Partanen TA, et al. (2000) VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* 14:2087–2096.
- Schoppmann SF, et al. (2002) Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 161:947–956.
- Le Bras B, et al. (2006) VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat Neurosci* 9:340–348.
- Orlandini M, et al. (2006) Vascular endothelial growth factor-D activates VEGFR-3 expressed in osteoblasts inducing their differentiation. *J Biol Chem* 281:17961–17967.
- Dumont DJ, et al. (1998) Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 282:946–949.
- Kaipainen A, et al. (1995) Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3566–3570.
- Enholm B, et al. (2001) Adenoviral expression of vascular endothelial growth factor-C induces lymphangiogenesis in the skin. *Circ Res* 88:623–629.
- Karpanen T, et al. (2006) Lymphangiogenic growth factor responsiveness is modulated by postnatal lymphatic vessel maturation. *Am J Pathol* 169:708–718.
- Louzier V, et al. (2003) Role of VEGF-B in the lung during development of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L926–L937.
- Wirzenius M, et al. (2007) Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting. *J Exp Med* 204:1431–1440.
- Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K (2009) VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 21:154–165.
- Martin P (1997) Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276:75–81.
- Maruyama K, et al. (2007) Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. *Am J Pathol* 170:1178–1191.
- Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jähkola T, Alitalo K (2000) Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* 156:1499–1504.
- Saari A, et al. (2004) Vascular endothelial growth factor-C gene therapy restores lymphatic flow across incision wounds. *FASEB J* 18:1707–1709.
- Hos D, et al. (2011) Suppression of inflammatory corneal lymphangiogenesis by application of topical corticosteroids. *Arch Ophthalmol* 129:445–452.
- Yano A, et al. (2006) Glucocorticoids suppress tumor lymphangiogenesis of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 12:6012–6017.
- Yao LC, Baluk P, Feng J, McDonald DM (2010) Steroid-resistant lymphatic remodeling in chronically inflamed mouse airways. *Am J Pathol* 176:1525–1541.
- Greco KV, Lara PF, Oliveira-Filho RM, Greco RV, Sudo-Hayashi LS (2006) Lymphatic regeneration across an incisional wound: Inhibition by dexamethasone and aspirin, and acceleration by a micronized purified flavonoid fraction. *Eur J Pharmacol* 551:131–142.
- Billiau A, Matthys P (2001) Modes of action of Freund’s adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 70:849–860.
- Mancardi S, et al. (1999) Lymphatic endothelial tumors induced by intraperitoneal injection of incomplete Freund’s adjuvant. *Exp Cell Res* 246:368–375.
- Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, Balmain A (1986) Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322:78–80.
- Achen MG, McColl BK, Stacker SA (2005) Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell* 7:121–127.
- Rinderknecht M, Detmar M (2008) Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *J Cell Physiol* 216:347–354.
- Dadras SS, et al. (2003) Tumor lymphangiogenesis: A novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 162:1951–1960.
- Skobe M, et al. (2001) Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* 159:893–903.
- Supino R, Prosperi E, Formelli F, Mariani M, Parmiani G (1986) Characterization of a doxorubicin-resistant murine melanoma line: Studies on cross-resistance and its circumvention. *Br J Cancer* 54:33–42.
- Zhang N, Fang Z, Contag PR, Purchio AF, West DB (2004) Tracking angiogenesis induced by skin wounding and contact hypersensitivity using a Vegfr2-luciferase transgenic mouse. *Blood* 103:617–626.
- Massoud TF, Gambhir SS (2003) Molecular imaging in living subjects: Seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 17:545–580.
- Mumprecht V, Detmar M (2009) Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *J Cell Mol Med* 13(8A):1405–1416.
- Harrell MI, Iritani BM, Ruddell A (2007) Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis. *Am J Pathol* 170:774–786.

it affects their optical and mechanical properties, as well as their toxicity. Martin Ploschner and his colleagues at the University of St Andrews, UK, report an efficient way to sort gold nanoparticles by size using laser light.

The team aimed green and red lasers at a thin layer of water containing a mixture of gold nanoparticles 100 and 130 nanometres in diameter. The green light's frequency matched that of the electrons in the smaller nanoparticles. This resonance enhanced forces acting on the particles, pushing them in one direction. The red light interacted with the larger particles, moving them in the opposite direction.

The researchers suggest that the method could sort nanoparticles more finely than current methods, which rely on centrifugation.

**Nano Lett.** <http://dx.doi.org/10.1021/nl204378r> (2012)

## GENETICS

## Fewer imprinted genes at re-count

Most mammalian cells have one maternal and one paternal copy of most genes, but some genes carry a molecular signature or 'imprint' that silences one copy. Tomas Babak at Stanford University in California and his team mapped the imprinted genes in mouse brains and found far fewer than recent estimates had suggested.

In 2010, two studies found more than 1,300 imprinted genes in the mouse brain, ten times more than traditional counts. The increase was attributed to improved RNA-sequencing technology. When Babak *et al.* repeated the experiments, they found only 13% of the imprinted genes first identified by the 2010 studies and uncovered statistical weaknesses that resulted in many false-positive signals. Using a different analytical approach, the authors identified roughly 50 new candidate imprinted genes.

Having a catalogue of imprinted genes is important for understanding why imprinting occurs and how it can go awry.

**PLoS Genet.** **8**, e1002600 (2012)

## MOLECULAR IMAGING

## Follow the lymph vessels

Lymph vessels grow as wounds heal and cancers spread — a process that can be imaged in living animals, researchers demonstrate in mice.

Lymph vessels often sprout at sites of inflammation, and their growth has been linked to tumour metastasis. Sagrario Ortega at the Spanish National Cancer Research Centre in Madrid and her colleagues genetically engineered a mouse to express a luminescent protein under the control of the gene *Vegfr3*, a lymphatic marker.

The team imaged live mice, tracking vessel growth during embryo development, wound healing and inflammation. They also watched as lymph vessels grew at the edge of melanoma tumours and in lymph nodes infiltrated by the cancer. This vessel growth may aid the spread of cancer to distant organs, the authors say. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1115542109> (2012)

## MATERIALS

## A graphene window on liquids

By using graphene membranes as viewing 'windows', researchers have filmed nanocrystals growing in liquids at atomic resolution.

Studying structures in liquids at the atomic level is challenging because the imaging technique of choice, transmission electron microscopy, requires that samples be in a vacuum to maximize their interactions with the electron beam. Air-tight capsules can be used to enclose liquids, but are thick and made of materials

## COMMUNITY CHOICE

The most viewed papers in science

## CANCER

## Small, cancer-resistant mice



Boosting the levels of a tumour-suppressor protein in mice makes them smaller and more metabolically efficient, as well as resistant to cancer.

Pier Paolo Pandolfi at Beth Israel Deaconess Medical Center in Boston, Massachusetts, and his colleagues genetically engineered mice to have additional copies of *Pten*, a gene that is mutated or deleted in many cancers. The mice are smaller than normal because they have fewer cells. When injected with a carcinogen, the animals developed tumours later than controls.

The transgenic mice burn energy at a higher rate. Cells from these mice consume less glucose than normal mouse cells but generate more ATP — the energy molecule created during cellular respiration — indicating a more efficient metabolism.

Increasing levels of the PTEN protein could offer a therapeutic approach to preventing both cancer and obesity. **Cell** **149**, 49–62 (2012)

that interfere with passing electrons, resulting in a blurred picture. Membranes made of graphene — atomically thin sheets of carbon atoms — are both impermeable to liquids and much more transparent to electrons.

Paul Alivisatos at the Lawrence Berkeley National Laboratory in Berkeley, California, and his colleagues used these graphene windows to create atomic-resolution movies of platinum nanocrystals clumping together in a liquid.

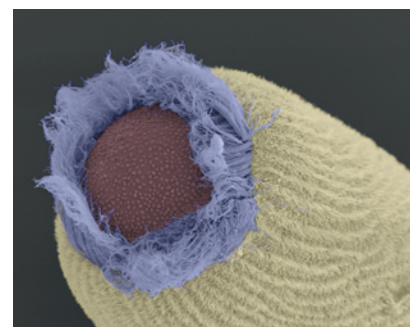
**Science** **336**, 61–64 (2012)

## ZOOLOGY

## Vision with no nervous system

Sponge larvae can detect light despite lacking a nervous system or the photosensitive 'opsin' proteins found in all other known animal eyes. Instead, another pigment called cryptochrome may underlie the light-sensing ability of the sponge *Amphimedon queenslandica* (pictured), report Todd Oakley at the University of California, Santa Barbara, and his colleagues.

Cryptochromes mainly



absorb blue light and, in other animals, have been implicated in functions from setting circadian rhythms to sensing magnetic fields. The authors identified two cryptochrome genes in the sponge. One, *Aq-Cry2*, is expressed in the 'ring eyes' of *A. queenslandica* larvae and has an absorbance peak similar to the wavelengths that trigger larval activity.

Because eye evolution in other animals has always involved opsins, the use of cryptochrome represents a separate lineage of eye evolution, the team suggests. **J. Exp. Biol.** **215**, 1278–1286 (2012)

## NATURE.COM

For the latest research published by Nature visit:

[www.nature.com/latestresearch](http://www.nature.com/latestresearch)

S. LEYS

## Visualising lymphangiogenesis in vivo

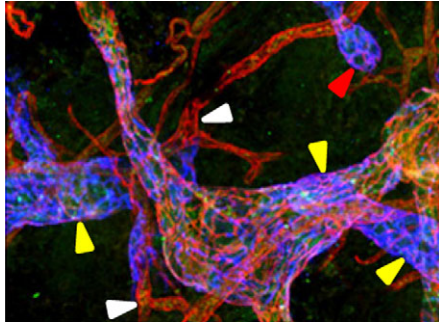


Image reproduced from Martínez-Corral et al. (2012).

Lymph vessel growth, also known as lymphangiogenesis, is crucial during development, wound healing, inflammation and tumour metastasis. To enable non-invasive detection and quantification of lymphangiogenesis, Martínez-Corral et al. developed a mouse model expressing an enhanced green fluorescent (EGFP)-luciferase (Luc) fusion protein under the control of endogenous *VegfR3* (encoding vascular endothelial growth factor receptor 3, a lymphatic marker). *VegfR3*<sup>EGFP<sup>Luc</sup></sup> knock-in mice were used to visualise lymphangiogenesis during development and postnatally, when *VegfR3* expression is downregulated. Additionally, growth-factor-stimulated lymphangiogenesis was visualised in live, adult mice using VEGF-C, which resulted in an eightfold increase in Luc signal compared with control mice. The authors also validated their model by visualising lymphangiogenesis during wound healing and inflammation. Finally, they demonstrated that their model is suitable for visualising tumour-induced lymph vessel growth. These mice provide a novel and highly sensitive tool to study the involvement of lymphangiogenesis in normal development and various pathological conditions.

Martínez-Corral, I., Olmeda, D., Diéguez-Hurtado, R., Tammela, T., Alitalo, K. and Ortega, S. (2012). In vivo imaging of lymphatic vessels in development, wound healing, inflammation, and tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [Epub ahead of print] doi: 10.1073/pnas.1115542109.

## MYCN and mutationally activated ALK synergise in neuroblastoma

Childhood neuroblastoma, a neuroendocrine tumour of the peripheral sympathetic nervous system, is associated with

amplification of the *MYCN* oncogene and mutational activation of *ALK* (encoding anaplastic lymphoma kinase). Models that clarify whether and how these genes interact in the development of neuroblastoma are limited. Zhu et al. generated transgenic zebrafish overexpressing human *MYCN* and activated *ALK*, resulting in tumours that closely mimic those observed in the human disease. The authors show that *MYCN* overexpression alone causes aberrant neuroblast hyperplasia early during development, which is offset in part by a subsequent apoptotic event; surviving *MYCN*-overexpressing cells fail to differentiate and give rise to neuroblastoma. Co-expression of mutationally activated *ALK* blocks the apoptotic event but does not restore neuroblast differentiation, tripling penetrance and accelerating the onset of neuroblastoma. These results provide insight into the synergistic relationship between two important mediators of neuroblastoma, and could help in developing treatments for the disease.

Zhu, S., Lee, J. S., Guo, F., Shin, J., Perez-Atayde, A. R., Kutok, J. L., Rodig, S. J., Neuberg, D. S., Helman, D., Feng, H. et al. (2012). Activated *ALK* collaborates with *MYCN* in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Cell* **21**, 362-373.

## Cardiomyopathy: RBM20 mutations impair splicing of cardiac genes

Several genes have been associated with dilated cardiomyopathy (DCM), a condition conferring risk of heart failure and sudden death. Among these is RNA-binding motif protein 20 (*RBM20*), with mutations present in ~3% of individuals with DCM. Guo et al. now characterise a spontaneous rat model that explains how defects in *RBM20* function can cause cardiomyopathy and provides insight into normal regulation of heart function. The mutant rats were known to have impaired splicing of titin, a sarcomeric protein that confers structure and function to striated muscle. Guo et al. determined that *RBM20* is required for titin splicing, as well as for alternative splicing of many other conserved cardiac genes, as revealed by deep sequencing of rat and human samples. Defective splicing caused by *Rbm20* mutation in rats results in features resembling those of humans carrying *RBM20* mutations, including left ventricular dilatation, subendocardial fibrosis, arrhythmia and sudden death. These data explain how

*RBM20* mutations cause disease in a subset of individuals with DCM, and identify *RBM20* as a global regulator of heart function by controlling the alternative splicing of specific cardiac genes.

Guo, W., Schafer, S., Greaser, M. L., Radke, M. H., Liss, M., Govindarajan, T., Maatz, H., Schulz, H., Li, S., Parrish, A. M. et al. (2012). *RBM20*, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing. *Nat. Med.* [Epub ahead of print] doi:10.1038/nm.2693.

## Brain insulin resistance in Alzheimer's disease

Insulin resistance in the brains of individuals with Alzheimer's disease (AD) has been hypothesised, but its existence, causes and consequences have not been established. Talbot et al. now provide evidence that dysregulated insulin signalling in the brain is a common and early event in AD. They measured insulin signalling pathway activation in post-mortem human brain samples (in which functional signalling is maintained for several hours after death), focusing on the cerebellar cortex (CC), which exhibits pathology in late-stage AD, and the hippocampal formation (HF), which exhibits pathology in early-stage AD and is associated with cognitive decline. Compared with normal controls, activation of insulin signalling intermediates was lower in AD brains, especially in the HF. Insulin resistance was specifically associated with dysfunctional insulin receptor substrate 1 (IRS-1). The authors also identified two phosphorylated forms of IRS-1 (IRS-1pS<sup>616</sup> and IRS-1pS<sup>636/639</sup>) as candidate biomarkers of brain insulin resistance and show that they are elevated in the HF of individuals with AD even without a history of diabetes. Finally, they show that both potential biomarkers are negatively correlated with cognitive function. These data strengthen the hypothesis that brain insulin resistance contributes to the pathology of AD and indicate new avenues for prevention or therapy.

Talbot, K., Wang, H. Y., Kazi, H., Han, L. Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., Fuino, R. L., Kawaguchi, K. R., Samoyedny, A. J., Wilson, R. S. et al. (2012). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* **122**, 1316-1338.

Written by editorial staff. © 2012. Published by The Company of Biologists Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Share Alike License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly cited and all further distributions of the work or adaptation are subject to the same Creative Commons License terms.